

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

Милан Б. Драгићевић

**Анализа субјединичног састава и
регулације изоформи глутамин-
синтетазе код биљака *Arabidopsis
thaliana* (L.) Heynh. и *Lotus
corniculatus* L.**

докторска дисертација

Београд, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Milan B. Dragičević

**Analysis of the subunit composition and
regulation of glutamine synthetase
isoforms from *Arabidopsis thaliana* (L.)
Heynh. and *Lotus corniculatus* L.**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Ментори:

др Ана Симоновић, виши научни сарадник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”
Универзитет у Београду

др Радивоје Продановић, доцент
Хемијски факултет
Универзитет у Београду

Чланови комисије:

др Љуба Мандић, редовни професор
Хемијски факултет
Универзитет у Београду

др Слађана Тодоровић, научни сарадник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”
Универзитет у Београду

Датум одбране:

Експериментални део докторске дисертације урађен је у оквиру пројекта основних истраживања Министарства просвете и науке Републике Србије (173024), у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду.

Желим да изразим захвалност менторима, посебно др Ани Симоновић на идејама, инспиративним разговорима, корисним сугестијама, несебичном ангажовању, континуаланој подршци и мотивацији током израде ове докторске дисертације. Показала ми је како да приђем истраживачком проблему и како да организујем експериментални рад ефикасно, у складу са литературом и доступним средствима. Такође огромну захвалност осећам према др Слађани Тодоровић на стимулативним разговорима, бодрењу и свеукупној помоћи током мог истраживачког рада. Желим да се захвалим др Радивоју Продановићу и др Љуби Мандић на помоћи током докторских студија и на указаном поверењу.

Захвалност дугујем колегиницама Биљани Филиповић на помоћи у гајењу калуса *A. thaliana* и др Радомирки Николић што ми је уступила своје културе звездана. Захвалан сам и др Невени Митић на сарадњи, а нарочито на томе што ме је упутила да испитам глутамин-синтетазе код звездана. Такође бих желео да се захвалим колегиницама и колегама Милицы Богдановић, Јелени Платиши, Тијани Бањанац, Јасмини Несторовић Живковић, др Данијели Мишић, др Сузани Живковић, др Славици Дмитровић, Милицы Милутиновић, Набилу Галавенџију и др Браниславу Шилеру на сарадњи и позитивној атмосфери. Посебну захвалност осећам према професору Златку Гиби, на поверењу, пријатељском односу и конструктивним разговорима на различите теме. Желео бих да поменем, и да се захвалим професору Драгољубу Грубишићу. Он је својом мудрошћу сваком проблему могао да нађе решење, а рад, без њега у близини, једноставно није исти.

Нарочиту захвалност осећам према мојој Јелени која је била, и наставља да буде, континуални извор подршке у приватном и професионалном животу.

Анализа субјединичног састава и регулације изоформи глутамин-синтетазе код биљака *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и *Lotus corniculatus* L.

Резиме

Глутамин-синтетаза (*GS*) каталише асимилацију амонијум-јона пореклом од редукције нитрата, фотореспирације, катаболизма аминокиселина, фиксације N_2 код легуминоза и других метаболичких процеса код биљака. Код виших биљака, мала фамилија гена кодира различите цитосолне (*GS1*) изоформе, док један ген кодира изоформу локализовану у пластидима (*GS2*). Заједно са глутамат-синтазом (*GOGAT*), *GS* је део двоензимског циклуса одговорног за биосинтезу глутамата, који је дозор аминокиселинама у реакцијама каталисаним различитим трансминазама. Стицање додатних сазнања о *GS* је од пресудног значаја за разумевање процеса асимилације азота код виших биљака, што може довести до боље ефикасности у коришћењу доступног азота и смањеној употреби вештачких ђубрива.

У презентованом истраживању испитивана је структура и регулација *GS* изоформи из две модел-биљке, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh и *Lotus corniculatus* L. Један од циљева био је испитивање могућности различитих *GS1* протеина *A. thaliana*, чији геном кодира пет *GS1* субјединица (*GLN1;1-1,5*), да формирају хетеромере. Како би се испитао субјединични састав *GS1* изоформи *A. thaliana*, упоређени су електрофоретски профили *GS* изоформи различитих *GS1 SALK* и *SAIL knockout* мутаната. Закључено је да *GLN1;1* и *GLN1;3*, као и *GLN1;2* и *GLN1;3*, а могуће и *GLN1;1* и *GLN1;2* субјединице могу да се комбинују у свим стехиометријским односима формирајући функционалне декамерне ензиме. Поред тога, код *knockout* мутаната у *GLN1;2* и *GLN1;3* детектована је повишена количина *GLN1;1* транскрипата што упућује да *GLN1;1* делом компензује недостајуће изоформе. Други циљ овог истраживања био је испитивање регулације експресије *GS* и *GOGAT* гена *A. thaliana* биљним регулаторима растења: кинетином, абсцисинском киселином, гиберелинском киселином и 2,4-дихлорфеноксиацетатом. Експресија *GS* и *GOGAT* гена је диференцијално регулисана регулаторима растења у листу и корену, а добијени обрасци

експресије упућују на могући физиолошки контекст хормоналне регулације ових гена током развића биљке и као одговору на услове средине. Трећи циљ је био испитивање хормезе индуковане фосфинотрицином (*PPT*) код звездана (*L. corniculatus*). *PPT* је инхибитор *GS* који је пронашао примену као неселективни хербицид. Инхибиција *GS* у биљци доводи до нагомилавања амонијака, недостатка глутамина и коначно, до смрти. Утврђено је да биљке *L. corniculatus* третиране ширим опсегом концентрација *PPT*-а, показују двофазни одговор који обухвата стимулацију продукције биомасе при концентрацијама нижим од 50 μM , и инхибицију раста и смрт биљке при вишим концентрацијама. Стимулација раста ниским концентрацијама *PPT*-а је последица активације *GS2* изоформе, док је инхибиција раста и смрт биљке при високим концентрацијама хербицида проузрокована инхибицијом *GS1* и *GS2* изоформи. Предложен је детаљан молекулски механизам концентрационо-зависне интеракције *GS* холоензима са *PPT*-ом, који је у складу са експерименталним и литературним подацима.

Кључне речи: глутамин-синтетаза, *Arabidopsis thaliana*, *Lotus corniculatus*, фосфинотрицин, *knockout* мутант, субјединични састав ензима, биљни регулатори растења, регулација експресије, редундантност ензима

Научна област: Биохемија

Ужа научна област: Биохемија биљака

УДК број: 577.151.3

Analysis of the subunit composition and regulation of glutamine synthetase isoforms from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. and *Lotus corniculatus* L.

Summary

Glutamine synthetase (GS) is the key enzyme involved in the assimilation of ammonia derived from nitrate reduction, photorespiration, amino acid catabolism, N₂ fixation in legumes, and other metabolic processes in plants. A small gene family encodes for different cytosolic (GS1) isoforms in higher plants, while a single gene encodes for the plastidic isoform (GS2). GS operates with glutamate synthase (GOGAT) in a two enzyme cycle. The net outcome of this cycle is the production of glutamate, which, through the action of aminotransferases, is used to synthesize other amino acids. Gaining further knowledge about GS is essential for understanding nitrogen assimilation in higher plants, which can lead to better nitrogen use efficiency and lowering of fertilizer input.

The structure and regulation of GS isoforms from two model plants, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh and *Lotus corniculatus* L. were investigated in the presented study. Since the *A. thaliana* genome encodes five GS1 subunits (*GLN1;1-1,5*), one of the objectives was to investigate whether different GS1 proteins from this plant are able to form heteromeric enzymes. In order to identify the subunit composition of *A. thaliana* GS1 isoforms, electrophoretic profiles of GS isoforms from GS1 SALK and SAIL knockout mutants were compared. It was concluded that *GLN1;1* and *GLN1;3*, as well as *GLN1;2* and *GLN1;3* and possibly *GLN1;1* and *GLN1;2* are able to form functional heterodecamers in all stoichiometric proportions. Furthermore, in the knockout mutants lacking *GLN1;2* and *GLN1;3*, higher *GLN1;1* transcript levels were found implicating that *GLN1;1*, at least in part, compensates for the missing isoforms. The second objective of this study was to investigate the regulation of expression of *A. thaliana* GS and GOGAT genes by plant growth regulators: kinetin, abscisic acid, gibberelic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. The expression of GS and GOGAT genes is differentially regulated by growth regulators in the leaf and root. The observed patterns of expression provide insights into the hormonal regulation of these genes during development and as response to environmental cues. The third objective was to

investigate phosphinothricin (PPT) induced hormesis in *L. corniculatus*. PPT is a potent GS inhibitor used as a non selective post emergence herbicide. GS inhibition in plants causes ammonia accumulation, glutamine depletion and eventually death. However, the growth response of *L. corniculatus* plants immersed in solutions with a broad range of PPT concentrations is biphasic, with pronounced stimulating effect on biomass production at concentrations $\leq 50 \mu\text{M}$ and growth inhibition at higher concentrations. The growth stimulation at low PPT concentrations is a result of activation of GS2, while the growth suppression is caused by inhibition of both GS1 and GS2 at higher PPT concentrations. A detailed molecular mechanism of concentration-dependent interaction of PPT with the GS holoenzymes from *L. corniculatus* is proposed. The mechanism is in concurrence with all experimental and literature data.

Key words: glutamine synthetase, *Arabidopsis thaliana*, *Lotus corniculatus*, phosphinothricin, hormesis, knockout mutant, subunit composition, plant growth regulator, regulation of expression, enzyme redundancy

Scientific field: Biochemistry

Specific scientific field: Plant Biochemistry

UDC number: 577.151.3

Садржај

1. Увод.....	1
1.1 Глутамин-синтетаза.....	1
1.1.1 Улога GS у асимилацији азота.....	1
1.1.2 Структура биљне GS и механизам катализе.....	5
1.1.3 Регулација експресије и активности биљне GS.....	9
1.1.4 Функција и регулација GS код <i>A. thaliana</i>	13
1.2 Глутамат-синтаза код <i>A. thaliana</i>	18
1.3 Улога биљних регулатора растења у асимилацији азота.....	19
1.3.1 Цитокинини.....	20
1.3.2 Ауксини.....	21
1.3.3 Абсцисинска киселина.....	23
1.3.1 Гиберелини.....	25
1.4 Аналоги глутамата као инхибитори GS.....	26
1.4.1 Метионин-сулфоксимин.....	26
1.4.2 Фосфинотрицин.....	26
1.5 Хормеза.....	28
1.5.1 Хорметички ефекти хербицида.....	28
1.6 Општи подаци о проучаваним врстама.....	30
1.6.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
1.6.1.1 Т-ДНК инсерционе библиотеке <i>A. thaliana</i>	31
1.6.2 <i>Lotus corniculatus</i>	32
2. Циљ рада.....	34
3. Материјал и методе.....	35
3.1 Биљни материјал.....	35
3.2 Услови гајења биљака.....	37
3.2.1 Раст Т1 генерације мутантних линија <i>A. thaliana</i>	37
3.2.2 Успостављање <i>in vitro</i> културе и раст биљака <i>A. thaliana</i> на течnoj подлози.....	37
3.2.2.1 Третман биљним регулаторима растења.....	38

3.2.3	Раст биљака <i>A. thaliana</i> на чврстој подлози	39
3.2.4	Култура калуса <i>A. thaliana</i>	40
3.2.5	<i>In vitro</i> култура звездана и третман <i>BASTA</i> [®] -ом	41
3.3	Изолација РНК тризолом	41
3.4	Изолација РНК помоћу помоћу <i>Spectrum</i> [™] <i>Plant Total RNA Kit</i> -а	43
3.5	Изолација ДНК <i>mini-prep</i> <i>CTAB</i> методом	43
3.6	Третман дезоксирибонуклеазом	44
3.7	Реверзна транскрипција	45
3.8	<i>PCR</i> амплификација	46
3.9	Агарозна електрофореза нуклеинских киселина	49
3.10	Припремање стандарда за апсолутну квантификацију пречишћавањем <i>PCR</i> продуката са гела	49
3.11	Квантитативни <i>PCR</i>	50
3.12	Методe за селекцију Т-ДНК инсерционих хомозигота РНК маркерима ..	50
3.12.1	Експериментални дизајн	50
3.12.2	„ <i>SucPrep</i> ” метода	51
3.12.3	„ <i>Touch and go</i> ” метода	51
3.13	Екстракција и квантификација укупних слободних аминокиселина	53
3.14	Екстракција солубилних протеина	54
3.15	Екстракција протеина из фракције обогаћене хлоропластима	54
3.16	Нативна електрофореза са детекцијом <i>GS</i> изоформи	55
3.17	Екстракција протеина из гела и денатуришућа електрофореза	57
3.18	Пренос протеина са гела на мембрану и детекција антителима	58
3.19	Анализа скенираних гелова	59
3.20	Статистичка обрада података	60
3.21	Остали коришћени програми	60
4.	Резултати	61
4.1	Протокол за екстракцију <i>GS</i> протеина са нативних гелова након детекције ензимске активности	61
4.2	Утицај различитих услова гајења и врсте ткива на електрофоретске профиле <i>GS</i> изоформи код <i>A. thaliana</i>	62
4.3	Експресија <i>GS</i> гена у различитим ткивима <i>A. thaliana</i>	64

4.4	Регулација експресије гена <i>GS-GOGAT</i> циклуса биљним регулаторима растења.....	67
4.4.1	Утицај третмана биљним регулаторима растења на садржај укупних слободних аминокиселина	76
4.5	Селекција хомозиготних мутаната за Т-ДНК инсерцију у <i>GS</i> генима код <i>A. thaliana</i>	77
4.5.1	Избор и оптимизација методе за брзу селекцију Т-ДНК инсерционих мутаната РНК маркерима	78
4.5.2	Селекција хомозиготних <i>knockout</i> мутаната „ <i>Touch and go</i> ” приступом	79
4.5.3	Селекција хомозиготних мутаната на нивоу ДНК	80
4.6	Експресија <i>GS</i> гена у <i>knockout</i> мутантима.....	84
4.7	Изоформски профили глутамин-синтетаза код <i>knockout</i> мутаната	85
4.8	Утицај ниских концентрација <i>PPT</i> -а на активност <i>GS</i> изоформи и раст биљка <i>L. corniculatus</i>	87
4.8.1	Утицај сублеталних концентрација <i>PPT</i> -а на прираст биомасе изданак <i>L. corniculatus</i>	88
4.8.2	Електрофоретски профил <i>GS</i> изоформи код <i>L. corniculatus</i>	89
4.8.3	Утицај <i>PPT</i> -а на мобилност и активност <i>GS</i> изоформи.....	91
5.	Дискусија	96
5.1	Комбиновање нативне електрофорезе и денатуришуће електрофорезе са <i>western blot</i> -ом у испитивању <i>GS</i> изоформи	96
5.2	Експресија <i>GS</i> гена упућује да <i>GLN1;1</i> , <i>GLN1;2</i> и <i>GLN1;3</i> субјединице улазе у састав детектованих изоформи.....	98
5.3	Селекција <i>GS1 knockout</i> мутаната <i>A. thaliana</i>	99
5.4	Повећана експресија <i>GLN1;1</i> гена компензује недостатак <i>GLN1;2</i> и <i>GLN1;3</i> изоформи.....	101
5.5	Коришћење <i>knockout</i> мутанта за одређивање субјединичног састава <i>GS1</i> изоформи <i>A. thaliana</i>	103
5.6	Експресија <i>GS</i> и <i>GOGAT</i> гена <i>A. thaliana</i> је диференцијално регулисана биљним регулаторима растења	111
5.7	Мале дозе <i>PPT</i> -а повећавају активност и стабилност <i>GS2</i> што се позитивно одражава на прираст биомасе код <i>L. corniculatus</i>	114
6.	Закључци	125

7. Литература	126
8. Прилози	154
8.1 Прилог 1: Мапе експресије <i>GS</i> и <i>GOGAT</i> гена <i>A. thaliana</i>	154
8.2 Прилог 2: Листа скраћеница са речником	159
Биографија аутора	163

1. Увод

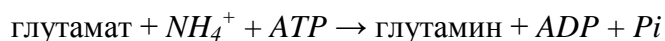
1.1 Глутамин-синтетаза

1.1.1 Улога GS у асимилацији азота

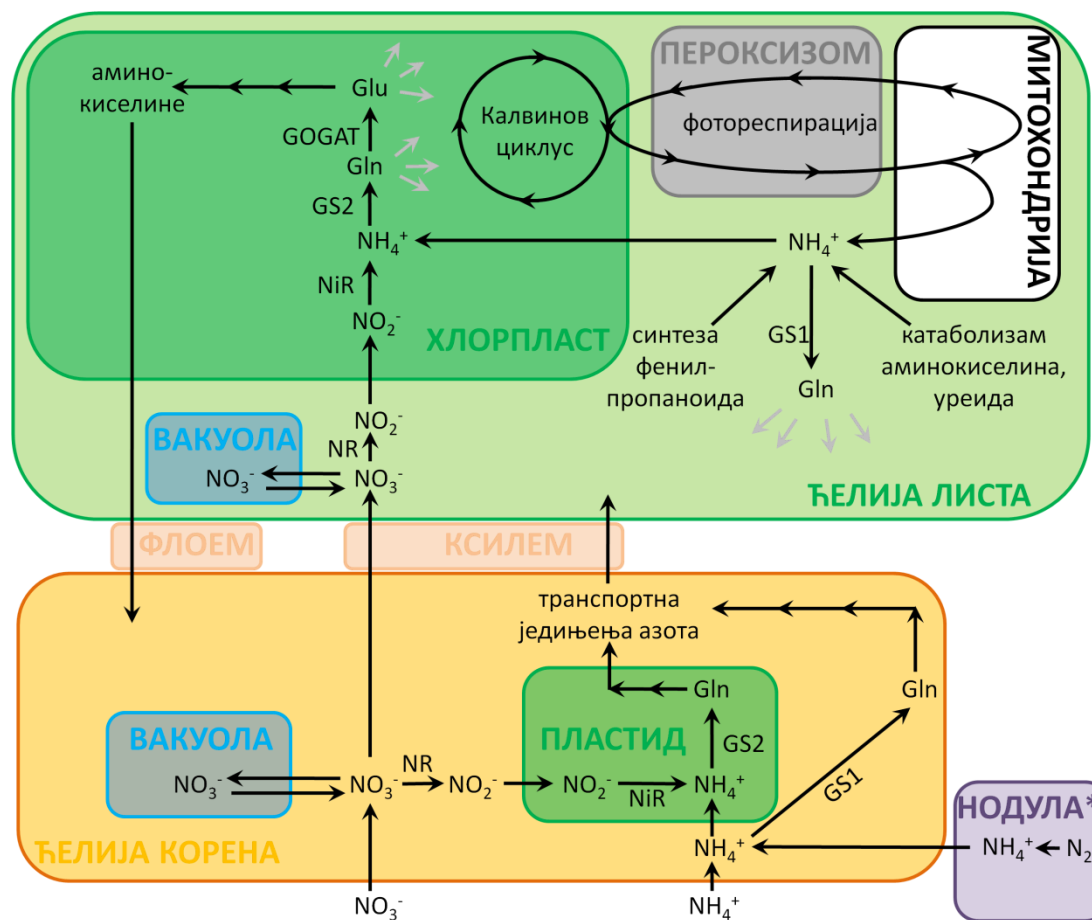
Азот је саставни део једињења есенцијалних за живот и четврти елемент по уделу у живим системима, иза кисеоника, угљеника и водоника. Молекуларни азот је, са 78 % (v/v), најзаступљенији елемент атмосфере. Ипак, овај огроман резервоар доступан је само малом броју организама који имају развијен апарат за редукцију овог веома стабилног молекула. Сви остали организми ослањају се на преузимање оксидованих и редукованих облика азота из средине. Доступност минералног азота у земљишту често је лимитирајући фактор за продуктивност природних и пољопривредних биљних система (*Lea и Azevedo, 2006*). Због тога се, на светском нивоу, троши око 100 милиона тона азотног ђубрива годишње за побољшање приноса пољопривредних култура (*Good и сар., 2004*). Разумевање фактора и процеса који утичу на преузимање азота из околине и његово искоришћење је кључно како би се повећала ефикасност и омогућио одржив раст у производњи хране за растућу популацију на Земљи.

Више биљке азот преузимају из земљишта апсорпцијом кроз коренов систем у облику нитрата и амонијум-јона (*Williams и Miller, 2001*). Код легуминоза и биљака са актиноризом део азота у ткиву је обезбеђен ендосимбиотском редукцијом молекулског азота из атмосфере (*Wall, 2000; Franche и сар., 2009*). У већини типова земљишта концентрација нитрата је за ред величине виша од концентрације амонијум-јона услед дејства нитрификујућих микроорганизама који оксидују амонијак до нитрата. Поред тога, нитрати су добро растворни и не везују се за анјонске глине присутне у многим земљиштима (*Nye и Tinker, 1977*). Управо ове две особине нитрата, доступност и мобилност у земљишту, утичу да биљке примарно преузимају азот у овом облику. У зависности од концентрације нитрата у земљишту и од биљне врсте, део преузетог нитрата се кроз ксилем преноси у листове (*Andrews, 1986*). Нитрат се у ћелијама корена и листа може складиштити у вакуолама, а пре асимилације у органска једињења, нитрат се редукује, прво до нитрита у реакцији каталисаном

ензимом нитрат-редуктазом (*NR*, *EC* 1.7.1.1-3), и даље до амонијака у реакцији каталисаном нитрит-редуктазом (*NiR*, *EC* 1.7.7.1). Поред апсорпције из земљишта и редукције нитрата, одређена количина амонијум-јона у биљној ћелији пореклом је из метаболичких процеса као што су фотореспирација, катаболизам аминокиселина, биосинтеза фенилпропаноида и метаболизам уреида (Слика 1). Фотореспирација је вероватно најзначајнији процес у коме се велике количине амонијака ослобађају приликом регенерације 3-фосфоглицерата у Калвинов циклус. Количина ослобођеног амонијака приликом конверзије глицина у серин у фотосинтетским ћелијама *C3* биљака је и до 10 пута већа од оне пореклом од примарне асимилације (*Keys* и сар., 1978). Било да је настао редукцијом нитрата преузетог из земљишта или води порекло из различитих метаболичких процеса, амонијак се асимилиује у метаболичке токове у реакцији каталисаном глутамин-синтетазом (*GS*, *EC* 6.3.1.2):



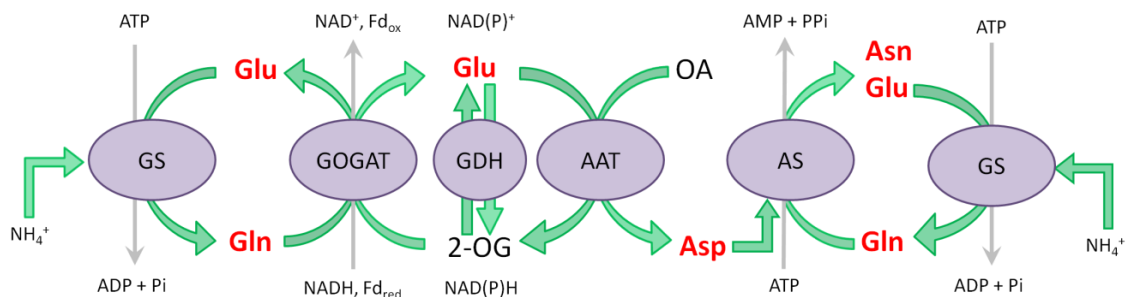
Биљке поседују два типа *GS* изоформе, цитосолне (*GS1*) и хлоропластне (*GS2*). Цитосолне *GS1* изоформе присутне су у свим ткивима, а нарочито у корену и васкуларним ткивима. *GS1* изоформе имају улогу у примарној асимилацији амонијака унетог из земљишта или насталог редукцијом нитрата у корену код нелегуминоза, односно амонијака насталог ендосимбиотском редукцијом атмосферског азота у нодулама лагуминоза (*Bernard* и *Habash*, 2009; Слика 1). Поред тога, значајну улогу *GS1* изоформе имају у ремобилизацији азота ослобођеног катаболизмом аминокиселина током сенесценције (*Masclaux* и сар., 2000; *Bernard* и *Habash*, 2009). Код већине биљака *GS1* изоформе су кодиране малим генским фамилијама које садрже од два до пет гена, чија је диференцијална експресија одговорна за различите улоге *GS1* изоформи током животног циклуса биљке (*Lam* и сар., 1996; *Sakakibara* и сар., 1996; *Bernard* и *Habash*, 2009).



Слика 1: Преузимање и асимилација азота код виших биљака. Коренов систем виших биљака преузима азот из земљишта у облику NO_3^- и NH_4^+ . Код легуминоза NH_4^+ настаје редуkcијом N_2 у нодулама захваљујући ендосимбиотским бактеријама из рода *Rhizobium*. Нитрат се може складиштити у вакуоли, транспортовати ксилемом до листова или бити редукован до амонијум-јона у корену. У ћелији корена амонијум-јон се инкорпорира у глутамин и даље трансформише у одговарајућа транспортна једињења која ксилемом допремају азот у листове. У листу амонијак може потицати од редуkcије NO_3^- , фотореспирације, катаболизма аминокиселина и уреида и биосинтезе фенолпропаноида. *GS1* - цитосолна глутамин-синтетаза; *GS2* - хлоропластна глутамин-синтетаза; *NR* - нитрат-редуктаза; *NiR* - нитрит-редуктаза; *GOGAT* - глутамат-синтаза; * - нодуле су присутне само код легуминоза. Илустрација је модификована према Betti и сар. (2012).

Хлоропластне *GS2* изоформе су код већине испитиваних биљака кодиране једним нуклеарним геном чија је експресија највиша у фотосинтетским ткивима (*Lam* и сар., 1996; *Betti* и сар., 2012). *GS2* је локализована у строми хлоропласта са улогом у реасимилацији амонијака ослобођеног током фотореспирације (*Wallsgrave* и сар., 1987; *Orea* и сар., 2002). Код *A. thaliana* *GS2* изоформа је пронађена и у митохондријама и тада је показано да се продукт истог *GS2* гена шаље у обе органеле (*Taira* и сар., 2004).

Глутамин, синтетисан у реакцији каталисаном *GS*-ом, је донор амидне групе одређеном броју једињења и код великог броја биљних врста је главни транспортни молекул азота. Ипак, пун значај *GS* ензима спознат је тек након открића биљне глутамат-синтазе (*GOGAT*), која функционише заједно са *GS* у двоензимском *GS-GOGAT* циклусу (*Lea* и *Mifflin*, 1974). Овај циклус каталише синтезу глутамата који је донор амино-групе аминокиселинама у реакцијама каталисаним различитим трансминазама. Биљке поседују два типа глутамат-синтазе, *Fd-GOGAT* (*EC* 1.4.7.1) која користи ферредоксин као електрон донора и *NADH-GOGAT* (*EC* 1.4.1.14) која користи *NADH* (*Forde* и *Lea*, 2007). Гени који кодирају *GOGAT* изоформе су локализовани у једру и кодирају протеине са пептидном секвенцом за транспорт у хлоропласт на *N*-терминусу, тако да су *GOGAT* изоформе локализоване у пластидима (*Ireland* и *Lea*, 1999). *GS-GOGAT* циклус функционише заједно са ензимима аспартат-аминотрансферазом (*AAT*, *EC* 2.6.1.1) и аспарагин-синтетазом (*AS*, *EC* 6.3.5.4), при чему се синтетишу аспартат и аспарагин (Слика 2). Ове четири аминокиселине - *Gln*, *Glu*, *Asp* и *Asn* чине највећи удео слободних аминокиселина код виших биљака и представљају доминантне транспортне форме азота кроз биљку (*Lam* и сар., 1996), са изузетком појединих легуминоза код којих су уреиди (алантоин) главни транспортни молекули азота (*Smith* и *Atkins*, 2002). Пре открића *GOGAT* ензима код биљака, сматрало се да је кључни ензим асимилације амонијака глутамат-дехидрогеназа (*GDH*, *EC* 1.4.1.2) која каталише реверзну аминацију/деаминацију у синтези, односно катаболизму глутамата. Данас се сматра да у физиолошким условима овај ензим има знатно већу улогу у катаболизму глутамата и регулацији односа аминокиселина у ћелији (*Forde* и *Lea*, 2007; *Fontaine* и сар., 2012).

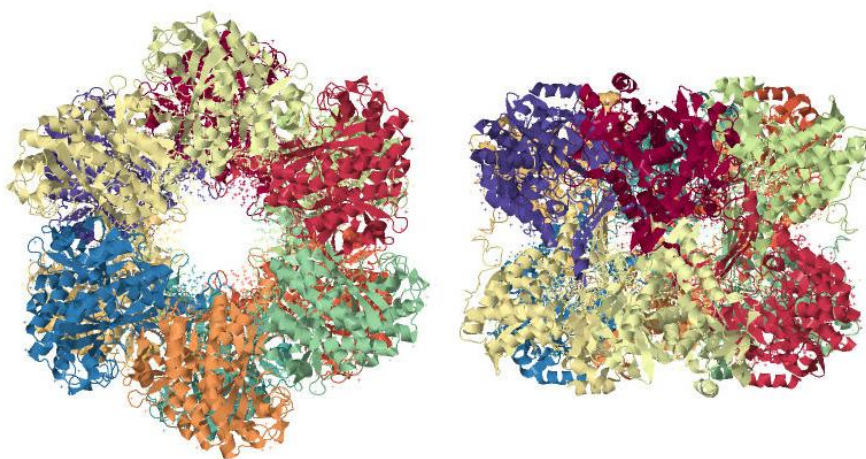


Слика 2: Кључни ензими асимилације амонијум-јона код биљака. Глутамин-синтетаза (GS) производи глутамин (Gln) од глутамата (Glu) и амонијум-јона уз утрошак једног молекула ATP-а. Глутамат-синтаза (GOGAT) као супстрате користи Gln и 2-оксоглутарат (2-OG) и преводи амидну групу Gln у амин-групу Glu формирајући два молекула Glu уз утрошак редукујућих еквивалената у виду фередоскина или NADH. Глутамат-деhidрогеназа (GDH) каталише реверзну реакцију деаминације/аминације Glu/2-OG и тиме регулише однос аминокиселина у ћелији. Аспартат-аминотрансфераза (AAT) каталише пренос аминокиселине са Glu на оксалацетат (OA) формирајући аспартат (Asp) који се даље преводи у аспарагин (Asn) у реакцији каталисаном аспарагин-синтетазом (AS) уз утрошак ATP-а. Четири аминокиселине Gln, Glu, Asp и Asn синтетисане у приказаним реакцијама представљају главна транспортна једињења азота код биљака и чине највећи удео слободних аминокиселина у ткиву. Илустрација је модификована према Betti и сар. (2012).

1.1.2 Структура биљне GS и механизам катализе

До данас су идентификоване три структурно различите класе глутамин-синтетазе: прокариотска *GSI*, еукариотска *GSII* и *GSIII* присутна код неких прокариота (Eisenberg и сар., 2000; van Rooyen и сар., 2011). Бактеријска *GSI* је до сада највише изучена: то је додекамер масе од око 600 *kDa*, састављен од истоветних субјединица које садрже око 470 аминокиселинских остатака (Eisenberg и сар., 2000). Прва кристална структура бактеријске *GS* постала је доступна за ензим из *Salmonella typhimurium* (Almassy и сар., 1986). Касније је структура рафинирана (Gill и Eisenberg, 2001), а решена је и структура ензима из *Mycobacterium tuberculosis* (Gill и сар., 2002; Krajewski и сар., 2005). Бактеријска *GSI* састоји се од 12 истоветних субјединица аранжираних у два хексамерна прстена позиционирана један изнад другог, са 12 активних центара који се

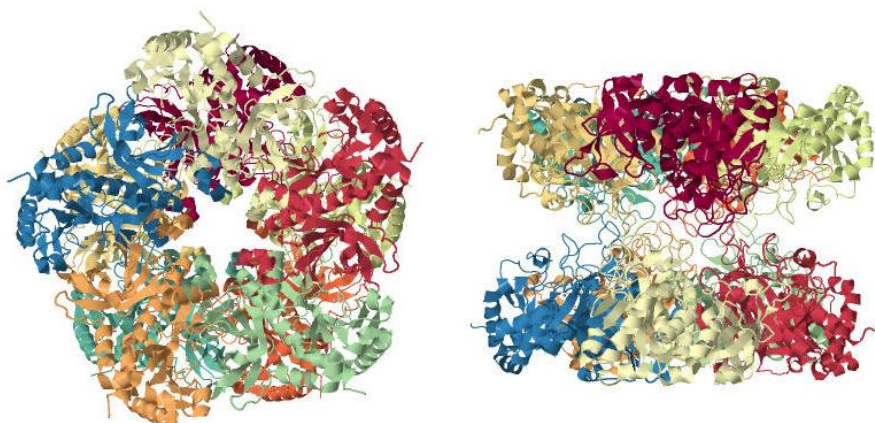
формирају на додирним местима између субјединица у хексамерима (Слика 3). Субјединице се састоје од мањег *N*-терминалног домена чију структуру чини шест антипаралелених β -плочица, и већег *C*-терминалног домена у чијој су структури доминантни α -хеликси, али који такође садржи шест антипаралелених β -плочица. Сваки активни центар састављен је од осам антипаралелених β -плочица, од којих шест припада *C*-терминалном домену једне субјединице, а две су из *N*-терминалног домена суседне. Поред тога, сваки активни центар садржи два ($nI-2$) метална катјона Mn^{+2} или Mg^{+2} . Два хексамерна прстена стабилизована су хидрофобним интеракцијама.



Слика 3: Структура *GSII* из *S. typhimurium*. PDB: 1F52 (Gill и Eisenberg, 2001).

Биљна *GSII* састоји се од истоветних субјединица које имају око 370 аминокиселинских остатака (Eisenberg и сар., 2000). Број субјединица у функционалном ензиму био је предмет истраживања преко три деценије, а на основу биохемијских метода и електронске микроскопије створен је модел по коме је *GSII* октамер сачињен од два тетрамерна прстена позиционирана један изнад другог (McParland и сар., 1976; Pushkin и сар., 1985; Llorca и сар., 2006). Структура биљних *GSII* ензима тек је недавно разјашњена захваљујући успешној кристализацији веома стабилне изоформе из кукуруза *GS1a* (Unno и сар., 2006). Према овој структури ензим се састоји од 10 истоветних субјединица аранжираних у два пентамерна прстена (Слика 4). Активни центри се формирају између суседних субјединица у пентамеру, тако да ензим садржи 10 активних центара. Сваки активни центар садржи три метална јона Mn^{+2} или Mg^{+2} .

Субјединице се састоје од мањег *N*-терминалног домена (1–103 аминокиселинска остатка) и већег *C*-терминалног домена (104–356), при чему *N*-терминални домен једне субјединице и *C*-терминални домен суседне формирају активни центар као код бактеријског ензима. Примарна структура показује сличност од 22,2 % са прокариотском *GS* из *M. tuberculosis*, док је сличност у терцијарној структури далеко већа и износи 84,2 %, што упућује да су прокариотски и еукариотски ензим дивергирани од заједничког претка. Структурне разлике између бактеријске и биљне *GS* укључују аминокиселинске остатке 393–478 који код биљног ензима нису присутни, а код бактеријског учествују у аденилацији, и остатке 143–154 који учествују у хидрофобним интеракцијама међу хексамерним прстеновима бактеријске *GS*. Део секвенце који учествује у везивању глутамата и двовалентних јона је конзервиран са 16 од 18 идентичних аминокиселинских остатака слично позиционираних код два типа ензима, тако да је механизам катализе вероватно конзервиран (*Eisenberg* и сар., 2000; *Unno* и сар., 2006). Биљна *GS* поседује вишеструко мању граничну површину међу пентамерним прстеновима од бактеријског ензима, 933 Å² наспрам 17,238 Å², јер је број аминокиселинских остатака који учествују у интеракцији међу прстеновима мањи.

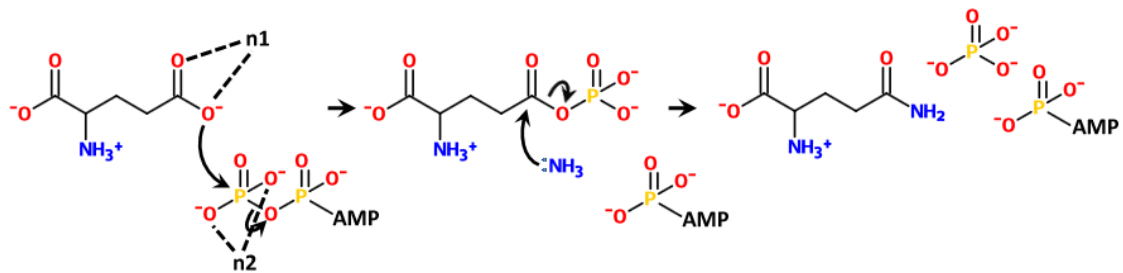


Слика 4: Структура *GSII* из *Z. mays*. PDB: 2D3A (*Unno* и сар., 2006).

Структура *GS1a* из кукуруза није одбацила могућност да биљни ензими могу да постоје и у облику октамера, у зависности од порекла ензима, секвенце, окружења ензима, присуства супстрата и посттранслационих модификација (*Betti*

и сар., 2012). Ипак све су чвршћи докази који указују на декамерну структуру еукариотских *GSII* ензима; на ово упућују кристалне структуре *GS* из квасца (*He* и сар., 2009), пса, човека (*Krajewski* и сар., 2008) и дикотиледоне биљке *Medicago truncatula* (*Seabra* и сар., 2009).

Механизам катализе бактеријског ензима до детаља је разложен анализом кристалних структура ензима, са различитим супстратима и инхибиторима, које приказују ензим током различитих фаза реакције (*Liaw* и *Eisenberg*, 1994). Ово је била својеврсна потврда кинетичких експеримената неколико истраживачких група током три деценије, чија су најзначајнија открића била да се током реакције формира активирани интермедијер γ -глутамил фосфат (*Krishnaswamy* и сар., 1960) и да везивање супстрата и отпуштање производа тече по уређеном *ter-ter* механизму (*Meek* и *Villafranca*, 1980). Према *Liaw* и *Eisenberg* (1994) активни центар ензима је цилиндричног облика са два отвора за супстрате *ATP* и *Glu*, који улазе у активни центар са различитих страна. Везивање *ATP*-а у активном центру доводи до конформационих промена и повећања афинитета везивног места за *Glu* чија се γ -карбоксилна група комплексира са Mn^{+2} - *n1*. Конформационе промене индуковане везивањем глутамата индукују пренос γ -фосфата са *ATP*-а на γ -карбоксилну групу *Glu*, што је помогнуто Mn^{+2} - *n2* који се комплексира са фосфатом. Након формирања активираниог карбоксилног угљеника отвара се везивно место за амонијум-јон, који се након везивања депротонизује како би нуклеофилним нападом на активирани карбоксил-фосфат формирао *Gln*. Након формирања производа долази до отварања активног центра и ослобађања *Gln* и *ADP* (Слика 5). Сматра се да је механизам катализе *GSII* идентичан због великих сличности у структури активних центара (*Unno* и сар., 2006). Ипак, могуће је да уочене разлике у везивном месту за *ATP* (*Unno* и сар., 2006) између биљног и бактеријског ензима имају за последицу одређене разлике у механизму катализе. Такође треба поменути да хлоропластне *GS2* изоформе поседују два цистеина у активном месту, која нису присутна код *GS1* изоформи (*Baima* и сар., 1989) чија улога у катализи није разјашњена.



Слика 5: Шематски приказ реакција које се одвијају у *GS* активном центру. γ -карбоксилна група глутамата комплексирана је са $n1$ (Mn^{+2} или Mg^{+2}), а γ -фосфат *ATP*-а је комплексиран са $n2$ (Mn^{+2} или Mg^{+2}). Нуклеофилни напад негативно наелектрисаног кисеоника из γ -карбоксилне група глутамата на γ -фосфат из *ATP*-а доводи до формирања активираниог интермедијера γ -глутамил-фосфата. Амонијак слободним електронским паром напада активирани карбоксил-фосфат при чему настаје глутамин.

1.1.3 Регулација експресије и активности биљне *GS*

Експресија и активност бактеријских *GSI* ензима регулисана је метаболичким статусом ћелије како би си испуниле потребе за *Gln* уз економично коришћење енергетских ресурса. Експресија бактеријске *GS* регулисана је репресијом/дерепресијом транскрипције гена која је зависна од количине доступног азота у подлози (*Woolfolk* и сар., 1966). На посттранслационом нивоу описана је комплексна циклична касакада код грам-негативних бактерија, која укључује аденилацију/деаденилацију ензима на одређеном *Tyr* остатку, при чему је аденилован ензим мање активан (*Stadtman*, 1990). Поред тога, *GS* из *E. coli* је инхибирана са девет различитих продуката метаболизма глутамин (*Ser*, *Ala*, *Gly*, *Trp*, *His*, *AMP*, *CTP*, карбамоил фосфат и глукозамин-6-фосфат), за које се сматрало да се везују за специфична алостерична места на ензиму изазивајући делимичну инхибицију активности. Што је више оваквих алостеричних места на ензиму окупирано лигандима то је степен инхибиције био већи, те је овај вид регулације назван кумулативна инхибиција повратном спрегом (*Woolfolk* и *Stadtman*, 1967). Касније је утврђено да на бактеријском ензиму не постоје алостерична везивна места за ове лиганде већ да различите аминокиселине компетирају са глутаматом, а нуклеотиди са *ATP*-ом за активно место (*Liaw* и сар., 1993; *Liaw* и *Eisenberg*, 1994; *Eisenberg* и сар., 2000). Код цијанобактерија описана

је инхибиција *GS* пептидним инхибиторима *IF7* и *IF17* (Garcia-Dominguez и сар., 1999), чија је експресија регулисана концентрацијом амонијум-јона у ћелији (Garcia-Dominguez и сар., 2000).

Већина истраживања регулације *GSII* код биљака фокусира се на контролу транскрипције. Биљни *GS* гени показују ткивно специфичну експресију, индукцију током специфичних фаза у развоју биљке, реагују на концентрације одређених метаболита у ћелији и на екстерне услове међу којима су најбоље изучени концентрација нитрата и амонијум-јона у подлози и светлост.

Индукција експресије *GS* гена током различитих фаза развића показана је код неколико биљних врста. Три *GSI* гена из грашка и гени који кодирају нодуларне изоформе код соје индуковани су током развића нодула, при чему ово није повезано са продукцијом амонијака у нодулама јер је индукција ових гена детектована и када су нодуле формиране мутантним *Rhizobium* сојем (*nif*) дефектним у азотофиксацији (Walker и Coruzzi, 1989; Roche и сар., 1993; Temple и сар., 1996). Експресија два гена *Stgs1a* и *Stgs1b* који кодирају цитосолне *GS* код кромпира различито је регулисана током сенесценције: *Stgs1b* се индукује у паренхимским ћелијама проводних снопића, док број транскрипата гена чија је експресија највиша у листовима, *Stgs1a*, опада са прогресијом сенесценције (Teixeira и сар., 2005). Код кукуруза се *GSI-4* индукује током сенесценције (Hirel и сар., 2005; Martin и сар., 2005). Поред онтогенетске регулације, *GS* гени показују и ткивно специфичну експресију која даје назнаке о физиолошкој улози одређених изоформи. Гени са експресијом у нодулама код легуминоза имају улогу у асимилацији амонијака насталог фиксацијом азота (Forde и сар., 1989; Roche и сар., 1993). Гени са експресијом у васкуларним ткивима као што су *Stgs1b* код кромпира (Teixeira и сар., 2005), затим *Gln1-5* код дувана (Dubois и сар., 1996), *GLN1;2* и *GLN1;3* код *A. thaliana* (Ishiyama и сар., 2004b) имају улогу у синтези *Gln* за транспорт. Гени са експресијом у спољашњим слојевима корена као што су *GSI-1* код кукуруза (Martin и сар., 2006), *GLN1;1* код *A. thaliana* (Ishiyama и сар., 2004b), *OsGLN1;1* и *OsGLN1;2* код пиринча (Ishiyama и сар., 2004a) имају улогу у примарној асимилацији амонијум-јона пореклом из земљишта или редукције нитрата.

Спољашњи услови, пре свега доступност азота у подлози и светлост регулатори су транскрипције *GS* гена. Код већине испитиваних биљака показано је да повећање концентрације нитрата или амонијум-јона у подлози појачава експресију појединих *GS1* гена а смањује експресију других. Код соје додаток амонијумових соли, али не и нитрата, у подлогу биљкама које су претходно расле у недостатку азота, доводи до повећања количине нодуларних *GS1* транскрипата (Hirel и сар., 1987). Експресија *GS1* гена *OsGLN1;1* и *OsGLN1;2* у спољашњим слојевима корена пиринча реципрочно је регулисана концентрацијом амонијум-јона у подлози, *OsGLN1;1* индукован је при ниским концентрацијама, а *OsGLN1;2* високим (Ishiyama и сар., 2004a). У корену *A. thaliana* повећање концентрације амонијум-јона у подлози доводи до повећања *GLN1;2* транскрипата, а смањује експресију *GLN1;1* и *GLN1;4* (Ishiyama и сар., 2004b). У складу са улогом *GS2* изоформи у детоксикацији амонијака насталог током фотореспирације, светлост је примарни регулатор експресије *GS2* гена. Код сирка (*Sorghum*) светлост доводи до повећања *GS2* активности (Hirel и Gadal, 1982), док код грашка под утицајем светлости долази до акумулације *GS2* транскрипата (Edwards и Coruzzi, 1989), слично као и код *A. thaliana* (Oliveira и Coruzzi, 1999) и уљане репице (Ochs и сар., 1993). Ефекат светлости посредован је фитохромом (Edwards и Coruzzi, 1989; Oliveira и сар., 2001), а код *A. thaliana* и односом угљеничних скелета (шећера и кетокиселина) према аминокиселинама (*C/N* однос) у ткиву (Oliveira и Coruzzi, 1999; Oliveira и сар., 2001). Треба напоменути да су код одређених биљака и *GS1* гени индуцибилни светлошћу, што је показано код *A. thaliana* (Oliveira и Coruzzi, 1999), бора (Cantón и сар., 1999) и зелене салате (Sakamoto и сар., 1990).

Регулација активности биљних *GS* посттранслационим модификацијама знатно је мање испитивана у односу на регулацију транскрипције, а механизми који су до сада описани варирају од врсте до врсте. За разлику од бактеријског ензима, чија је активност регулисана аденилацијом/деадиниацијом, биљни ензим не садржи структурне елементе неопходне за овакву интеракцију. Ипак, неколико типова ковалентних модификација описано је код биљних *GS*: фосфорилација, гликозилација, оксидација и нитрозилација. Пластидна *GS2* изоформа из *M. truncatula* супстрат је калцијум-зависних киназа, које фосфорилују *Ser-97* што омогућава интеракцију са 14-3-3 протеинима и доводи до селективне протеолизе

овог ензима (*Lima* и сар., 2006а). Насупрот овоме, *GS1* изоформе из *M. truncatula* супстрат су калцијум-независних киназа које фосфорилују ензиме на неколико места, што у случају *GS1a* изоформе, доводи до повећања афинитета ка глутамату (*Lima* и сар., 2006b). Поред тога показано је да је фосфорилација *GS1* код *M. truncatula* повећана у кореновима са високим интензитетом фиксације азота, док је фосфорилација *GS1* изоформи у листовима регулисана светлошћу. Код *Brassica napus* такође је детектована фосфорилувана *GS1* која интерагује са 14-3-3 протеинима, што за разлику од *GS2* из *M. truncatula*, штити ензим од протеолизе и повећава његову активност (*Finnemann* и *Schjoerring*, 2000). Фосфорилација *GS1* код *B. napus* се одвија по циркадијалном ритму и регулисана је енергетским набојем ћелије (односно *ATP/AMP*). У нодулама соје брзина деградације *GS* протеина зависи од оксидације *His* и *Cys* у активном центру која је каталисана јонима метала (*Ortega* и сар., 1999). Гликозилација је детектована код пречишћених *GS2* изоформи из *C. roseus* (*Miranda-Ham* и *Loyola-Vargas*, 1992), међутим физиолошка улога ове модификације није објашњена. Нитрозилација тирозина детектована је код *GS1a* изоформе из *M. truncatula*, а овај тип ковалентне модификације доводи до инактивације ензима (*Melo* и сар., 2011). Нитрозилација *Tyr-167* повећана је у нодулама формираним мутантним *Rhizobium* сојем (*Fix⁻*) дефектним у азотофиксацији, односно када је повећана концентрација екстерног нитрата.

Регулација активности алостеричним интеракцијама са лигандима и асоцијацијом-дисоцијацијом субјединица такође су описани код биљних *GS*. *GS* пурификована из *L. minor* некомпетитивно је инхибирана *ADP*-ом, *AMP*-ом и аминокиселинама, *Ala*, *Asp*, *Gly* и *Ser* (*Stewart* и *Rhodes*, 1977). Слични резултати добијени су и са бактеријским ензимом (*Woolfolk* и *Stadtman*, 1967), али је касније показано да аминокиселине компетирају за везивно место за глутамат, а нуклеотиди за везивно место за *ATP* (*Eisenberg* и сар., 2000). Ефекат нуклеотида на активност биљне *GS* детаљно је испитана на изоформи пречишћеној из семена грашка (*Knight* и *Langston-Unkefer*, 1988), и тада је показано да свака субјединица има једно активно место и једно алостерично место за која могу да се вежу нуклеотиди *ATP* или *ADP*. При везивању за активно место *ADP* се понаша као компетитивни инхибитор *ATP*-а. Оба нуклеотода компетирају и за алостерично

место које има већи афинитет за *ADP*, а везивање *ADP* за ово место доводи до активације ензима. У случају када је *ATP* везан за алостерично место долази до смањења афинитета за супстрате и инхибиције ензима. Делимична потврда ових резултата дошла је са октамерним моделом ензима створеног на основу електронске микроскопије *GS* из *Lotus japonicus* (Llorca и сар., 2006). По овом моделу биљни *GS* је октамер са два тетрамерна прстена који настају интеракцијом два димера. Сваки пар димера садржи једно активно место, а при паковању два димера у тетрамер настају још два псеудо-активна места која могу да вежу *ATP*, али не и *Glu*, са могућом регулаторном улогом. Код шећерне репе детектовани су активни *GS* тетрамери у листовима (Mäck и Tischner, 1994) и кореновима трансформисаним са *Agrobacterium rhizogenes* (Mack, 1998), чија је количина варијала са стадијумом развоја и азотним статусом биљке (Brechlin и сар., 2000), што наговештава физиолошки значај дисоцијације-асоцијације субјединица.

1.1.4 Функција и регулација *GS* код *A. thaliana*

Геном *A. thaliana* садржи пет *GSI* гена (*GLN1;1* - 1;5) и један *GS2* ген (*GLN2*). Према броју гена ово је једна од већих *GS* фамилија код до сада испитиваних биљака, која је инфериорна једино у односу на пшеницу (Bernard и сар., 2008). *GS* гени *A. thaliana* су дисперговани на различитим хромозомима: *GLN1;1*, *GLN1;4* и *GLN2* налазе се на хромозому 5, *GLN1;2* и *GLN1;5* на хромозому 1, а *GLN1;3* налази се на хромозому 3. *GSI* гени кодирају протеине који се састоје од 353 - 356 аминокиселинских остатака (Слика 6) са високим степеном хомологије у секвенцама, која се креће од 79 до 92 % (Табела 1). Највећу хомологију у секвенци од 92 % деле *GLN1;1* и *GLN1;2*, док примарна структура *GLN1;5* показује највеће разлике у односу на остале цитосолне изоформе. Молекулска маса *GSI* протеина из *A. thaliana* износи 40 *kDa* (Ishiyama и сар., 2004b). Ген за *GS2* кодира протеин од 430 аминокиселинских остатака, од којих одређен број на *N*-терминусу (Табела 2; Слика 6) представља пептидну секвенцу за транспорт у хлоропласт (*chloroplast targeting peptide* - *cTP*) која се одстрањује приликом уноса у хлоропласт, тако да зрео протеин има масу од 44 *kDa* (Ishiyama и сар., 2004b).

Табела 1: Хомологија *GS* протеинских секвенци изоформи из *A. thaliana* у % сличности.

	<i>GLN1;2</i>	<i>GLN1;3</i>	<i>GLN1;4</i>	<i>GLN1;5</i>	<i>GLN2</i>
<i>GLN1;1</i>	92	86	88	79	76
<i>GLN1;2</i>	100	84	86	79	78
<i>GLN1;3</i>		100	83	82	74
<i>GLN1;4</i>			100	79	77
<i>GLN1;5</i>				100	69
<i>GLN2</i>					100

На основу гел-филтрације пречишћених рекомбинантних *GLN1;1* - *GLN1;4* (*E. coli*, *His-tag*) и смеше пречишћених *GSI* изоформи из биљке, одређена је маса од 320-380 *kDa* за нативне ензиме што одговара октамерној структури (Ishiyama и сар., 2004b).

Табела 2: Основни подаци о *GS* изоформама код *A. thaliana*.

изоформа	локус/ иРНК/ протеин/	иРНК [<i>bp</i>] (кодирајући регион [<i>bp</i>])	амино- киселинских остатака	<i>pI</i> / <i>MW</i> ¹ <i>MW</i> ²
<i>GLN1;1</i>	<i>AT5G37600</i> / <i>NM_123119.3</i> / <i>NP_198576.1</i>	1494 (186..1256)	356	5.28 / 39115.07 40 <i>kDa</i>
<i>GLN1;2</i>	<i>AT1G66200</i> / <i>NM_105291.3</i> / <i>NP_176794.1</i>	1499 (119..1189)	356	5.14 / 39207.13 40 <i>kDa</i>
<i>GLN1;3</i>	<i>AT3G17820</i> / <i>NM_112663.2</i> / <i>NP_188409.1</i>	1341 (90..1154)	354	5.72 / 38594.57 40 <i>kDa</i>
<i>GLN1;4</i>	<i>AT5G16570</i> / <i>NM_121663.2</i> / <i>NP_568335.1</i>	1269 (44..1114)	356	5.12 / 38986.81 40 <i>kDa</i>
<i>GLN1;5</i>	<i>AT1G48470</i> / <i>NM_103743.2</i> / <i>NP_175280.1</i>	1307 (74..1135)	353	6.20 / 38907.10
<i>GLN2</i>	<i>AT5G35630</i> / <i>NM_122954.3</i> / <i>NP_198413.1</i>	1829 (325..1617)	430 (385) ³	6.43 / 47410.61 (5.28 / 42474.76) ⁴ 44 <i>kDa</i>

Напомене:

¹ *pI* и *MW* одређени на основу секвенце

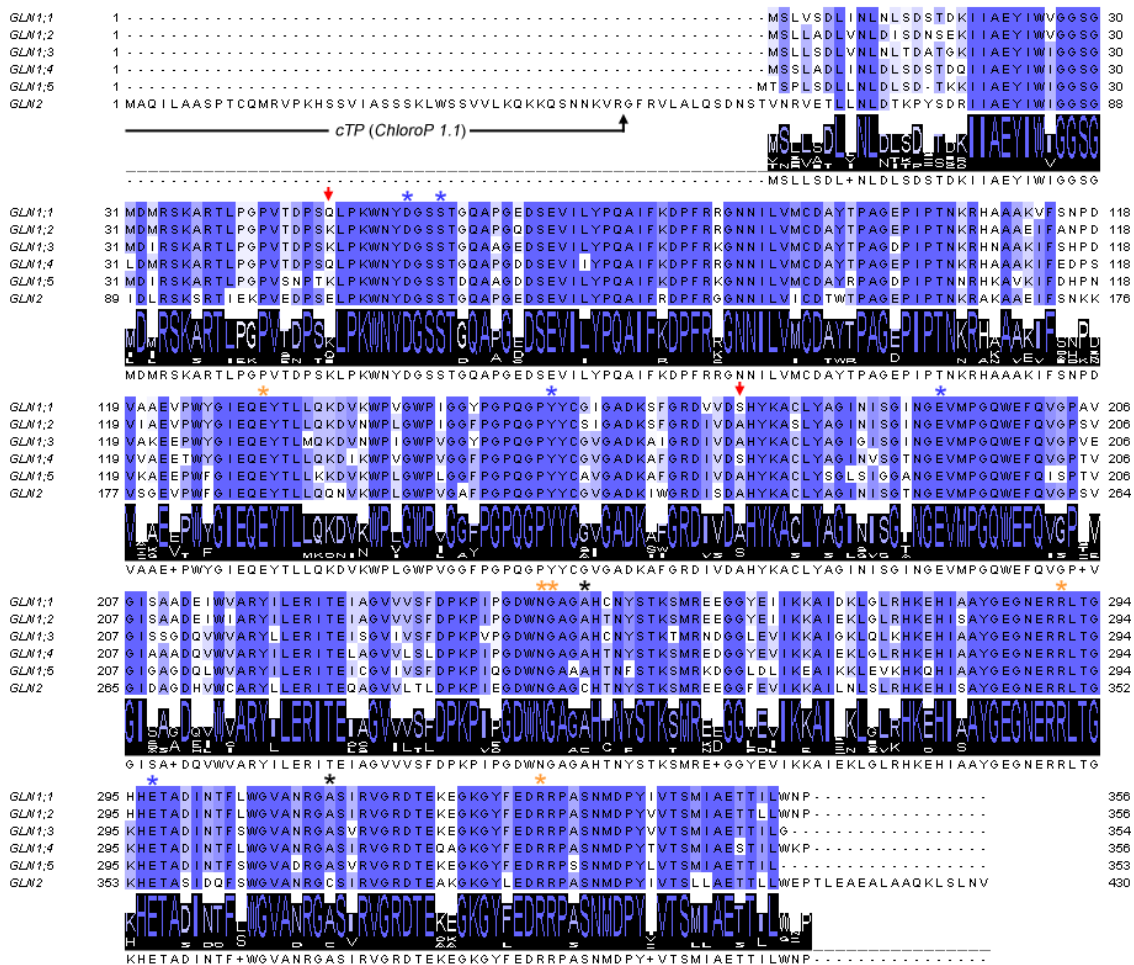
² *MW* одређен на основу миграције у *SDS* гелу (Ishiyama и сар., 2004b)

³ број аминокиселинских остатака без *cTP* секвенце

⁴ *pI* и *MW* одређени на основу секвенце *GLN2* без *cTP*

Испитивањем експресије *GSI* гена установљено је да *GLN1;1 - 1;4* имају значајан ниво експресије у корену (*Ishiyama* и сар., 2004b) и листовима из розете (*Lothier* и сар., 2011), док је количина *GLN1;5* транскрипата на граници детекције. Због овога су *GLN1;1 - GLN1;4* гени и њихови производи детаљније испитани. Коришћењем промотор-*GFP* фузионих гена показано је да *GLN1;1 - 1;4* имају локализовану експресију у специфичним ткивима корена (*Ishiyama* и сар., 2004b). Експресија *GLN1;1* је највиша у површинским слојевима корена, врху корена, у коренским длачицама и епидермалним ћелијама. Експресија *GLN1;2* и *GLN1;3* највиша је у ћелијама које граде васкулатуру корена, док је експресија *GLN1;4* локализована у перицикличним ћелијама базе латералних коренова. Анализом транскриптома *A. thaliana* у различитим ткивима и фазама развића показана је онтогенетска регулација експресије *GSI* гена (*Schmid* и сар., 2005; Прилог 1). Највише транскрипата *GLN1;1* детектовано је у сенесцентним листовима изнад розете и цветовима. Транскрипти *GLN1;2* били су обилни у готово свим ткивима осим у зрелим семенима и полену. Експресија *GLN1;3* била је највиша у стабљаци, у сенесцентним листовима и током ембриогеног развића, док је експресија *GLN1;4* била највиша у листовима изнад розете и сенесцентним листовима. Овим експериментом је утврђено да се највише *GLN1;5* транскрипата детектује у семену и цвету, међутим до сада није утврђена могућа улога *GLN1;5*.

Експресија *GLN1;1 - GLN1;4* гена је диференцијално регулисана доступношћу азота у подлози. У условима изгладњавања азотом индукују се *GLN1;1*, *GLN1;3* и *GLN1;4*, а долази до смањења експресије *GLN1;2* гена, док у условима изобиља азота долази до супресије експресије *GLN1;1*, *GLN1;3* и *GLN1;4* и знатног повећања количине *GLN1;2* транскрипата (*Ishiyama* и сар., 2004b). Експресија *GLN1;1*, *GLN1;2* и *GLN1;3* реципрочно је регулисана шећерима и аминокиселинама (*Oliveira* и *Coruzzi*, 1999), при чему додаток простих шећера - фруктозе, глукозе и сахарозе у подлогу доводи до повећања количине транскрипата, док додаток *Asp*, *Asn*, *Glu* и *Gln* снижава експресију ових гена.



Слика 6: Поређење предвиђених протеинских секвенци (изведених из иPHK) за GS изоформе из *A. thaliana*. Испод секвенци GS протеина, приказана је конзензусна секвенца са хистограмом учесталости. У GLN2 обележена је секвенца за транспорт у хлоропласт (сTP). Плавим звездицама (*) обележени су главни аминокиселински остаци који учествују у формирању везивног места за амонијум-јон, црвеним звездицама (*) обележени су главни аминокиселински остаци који учествују у формирању везивног места за глутамат, а црвеним стрелицама (↓) одређени су кључни аминокиселински остаци који одређују разлике у афинитету за супстрате, а тиме и каталитичку ефикасност различитих изоформи (Ishiyama и сар., 2006). Црним звездицама (*) обележена су два Cys присутна само код GS2 изоформи, чију позицију код GS1 заузимају Ala остаци (Vaitea и сар., 1989).

Испитивањем кинетике пречишћених рекомбинантних *His-tag* хомомерних *GLN1;1* - *GLN1;4* протеина показано је да *GLN1;2* и *GLN1;3* имају низак, док *GLN1;1* и *GLN1;4* имају висок афинитет за супstrate (*Ishiyama* и сар., 2004b). Највеће разлике у афинитету различитих изоформи опажене су у односу на амонијум-јон ($K_m < 10 \mu M$ за *GLN1;1*, $K_m = 2,45 mM$ за *GLN1;2*). Сем тога, *GLN1;3* изоформа показује супстратну инхибицију при вишим концентрацијама глутамата. Позиционом мутагенезом (*site-directed mutagenesis*) идентификоване су две аминокиселине одговорне за разлике у афинитету различитих изоформи, *Gln49* и *Ser174* (*Ishiyama* и сар., 2006). Нискоафинитетне изоформе *GLN1;2* и *GLN1;3* у овим позицијама имају *Lys49* и *Ala174* (Слика 6), при чему мутације *K49Q* или *A174S* у *GLN1;3* доводе до смањења K_m за амонијум-јон од око 4 пута. Реверзне мутације *Q49K* и *S174A* у високоафинитетној изоформи *GLN1;4* повећавају K_m за амонијум-јон око 7 пута.

Сагледани заједно ови подаци наговештавају специфичне улоге *GSI* изоформи код *A. thaliana*. При условима изобиља азота у подлози, нискоафинитетна *GLN1;2* изоформа, локализована у васкулатури корена, одговорна је за синтезу *Gln* који транспортује азот у листове. Ово је потврђено чињеницом да мутанти дефектни у *GLN1;2* имају мању биомасу розете када се биљке гаје у условима доступности азота (*Lothier* и сар., 2011). Низак афинитет *GLN1;2* према супстратима представља један вид контроле над количином асимилованог и транспортованог азота. При условима изгладњавања азотом индукује се експресија високоафинитетних изоформи *GLN1;1* и *GLN1;4* и експресија *AtATM1* транспортера амонијум-јона у спољашњим слојевима корена (*Rawat* и сар., 1999). Захваљујући овом систему биљка успева да синтетише *Gln* упркос малој количини доступног азота. Супресија *GLN1;2* и повећање експресије нискоафинитетне *GLN1;3* изоформе које је инхибирана глутаматом у васкулатури сугерише да се мање азота транспортује у листове како би био искоришћен за ремоделовање и раст корена опаженог у условима недостатка азота (*López-Bucio* и сар., 2003; *Walch-Liu* и сар., 2005b). Појачана експресија *GLN1;1*, *GLN1;3* и *GLN1;4* у сенесцентним листовима (*Schmid* и сар., 2005) наговештава да ове изоформе, поред улоге у примарној асимилацији азота, значајно место заузимају и у секундарној асимилацији амонијака насталог катаболизмом протеина и

аминокиселина. Поред повишене експресије током сенесценције *GLN1;1* изоформа је супстрат за *Ser/Thr* протеин киназу *AtCRK3*, чија је експресија такође повишена током сенесценције листова (*Li* и сар., 2006), што имплицира и посттранслациону регулацију *GSI* изоформи код *A. thaliana* током различитих фаза животног циклуса. Улога, регулација и кинетика *GLN1;5* до сада нису испитивани.

У складу са описаном улогом у детоксикацији амонијака насталог током фотореспирације (*Wallsgrave* и сар., 1987; *Edwards* и *Coruzzi*, 1989) експресија *GLN2* код *A. thaliana* регулисана је светлошћу кроз активност фитохрома и односом *C/N* једињења у листу. Када су биљке гајене у мраку изложене светлу дошло је до наглог пораста *GLN2* транскрипата већ након неколико сати (*Oliveira* и *Coruzzi*, 1999). Улога фитохрома као медијатора ове регулације утврђена је праћењем количине *GLN2* транскрипата код биљака које су изложене пулсу црвеног (*R*) дела спектра (650–670 nm) који активира фитохорм, и *R* пулсу праћеном пулсем далеке црвене (*FR*) светлости (705–740 nm) која инактивира фитохромску сигнализацију. Повећање броја транскрипата *GLN2* детектовано је у случају *R* пулса, али не и у случају *R + FR*. Слично као у случају *GSI* гена, експресија *GLN2* регулисана је односом шећера и аминокиселина у ткиву: додатак простих шећера (фруктозе, глукозе и сахарозе) у подлогу довео је до повећања експресије, док је додатак *Asp*, *Asn*, *Glu* и *Gln* довео до смањења броја транскрипата (*Oliveira* и *Coruzzi*, 1999). На основу ових експеримената закључено је да два медијатора учествују у преносу светлосних сигнала који регулишу експресију *GLN2*: први је фитохром, чија је активност директно повезана са квалитетом светлости, а други медијатор су прости шећери, чија се ендогена концентрација повећава асимилацијом угљеника у Калвиновом циклусу.

1.2 Глутамат-синтаза код *A. thaliana*

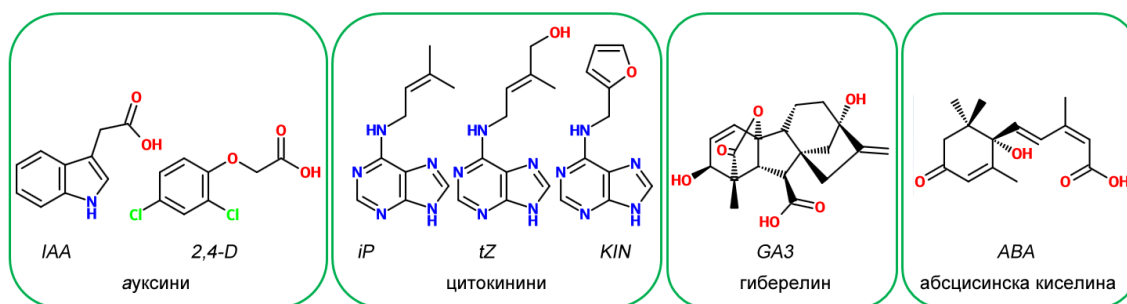
A. thaliana поседује два *Fd-GOGAT* гена *GLU1* и *GLU2* и један *NADH-GOGAT* ген *GLT1*. *NADH-GOGAT* се састоји од једног пептидног ланца од 2208 аминокиселина, при чему *N*-терминални домен показује висок степен хомологије са малом субјединицом *NADH-GOGAT* из *E. coli*, док је *C*-терминални

домен сличан великој субјединици овог ензима из *E. coli* (Lam и сар., 1996). *GLU1* кодира ензим који се састоји од 1622 аминокиселине, док *Fd-GOGAT* који кодира *GLU2* има 7 аминокиселина више. Сви ови протеини имају *cTP* на *N*-терминусу, који је у случају *GLT1* дужине 49 аминокиселина, за *GLU1* 69 аминокиселина, а за *GLU2* 72 аминокиселине. Хомологија између два *Fd-GOGAT* протеина износи 79 %, док је њихова сличност са *NADH-GOGAT* 41 % у случају *GLU1*, и 40 % у случају *GLU2*. Експресија *GLU1* гена је највиша у листовима и регулисана је светлошћу и концентрацијом сахарозе (Coschigano и сар., 1998). Репидно нагомилавање амонијум-јона у листу *GLU1 knockout* мутанта, умањен раст и хлороза при излагању фотореспирационим условима наговештава да је примарна улога *Fd-GOGAT* изоформе коју кодира овај ген управо у секундарној асимилацији амонијум-јона (Somerville и Ogren, 1980). *GLU1 knockout* мутанти имају умањен раст и у условима супресије фотореспирације повећаном концентрацијом CO_2 , што упућује на улогу и у примарној асимилацији амонијум-јона (Coschigano и сар., 1998). *GLU2* и *GLT1* гени највише експресију имају у корену, што упућује да изоформе кодирани овим генима имају улогу у примарној асимилацији амонијум-јона (Coschigano и сар., 1998; Lancien и сар., 2002). Експресија *GLT1* гена стимулисана је егзогеним нитратом (Wang и сар., 2000; Wang и сар., 2003). За детаљнију визуелизацију експресије *GOGAT* гена у различитим ткивима током развића *A. thaliana* погледати прилог 1.

1.3 Улога биљних регулатора растења у асимилацији азота

Због великих варијација у доступности азота, биљке су развиле сложене физиолошке и морфолошке одговоре којима балансирају раст и развиће са количином асимилованог азота из земљишта. Ови одговори укључују регулацију уноса амонијум-јона (Gazzarrini и сар., 1999) и нитрата (Naoa и сар., 2003), промене у архитектури корена (Walch-Liu и сар., 2005b) и одговарајућу прерасподелу ресурса између корена и надземног дела биљке (Walch-Liu и сар., 2005a). Пошто је организам виших биљака састављен од различитих ткива и органа који имају специфичне функције и потребе за нутријентима, јавља се потреба за координацијом физиолошких и морфолошких одговора на нивоу целе биљке. Како би се постигла комуникација о доступности азота унутар и између

биљних органа, користе се локални медијатори сигнала, и једињења способна за сигнализацију на даљину, међу којима се издвајају нитрат, аминокиселине, шећери и фитохормони (Forde, 2002b; Sakakibara и сар., 2006; Kiba и сар., 2011). Поред установљених улога током растења и развића биљака, постоји све више доказа да три класе фитохормона - цитокинини, ауксини и абсцисинска киселина заједничким деловањем координишу потражњу и усвајање азота (Signora и сар., 2001; Forde, 2002b; Wilkinson и Davies, 2002; Sakakibara и сар., 2006), док је улога осталих класа хормона непозната.



Слика 7: Биљни хормони: природни ауксин индолацетат (IAA), синтетички ауксин 2,4 дихлорфеноксиацетат (2,4-D), цитокинини N⁶-(Δ²-изопентенил)аденин (iP), trans-зеатин (tZ), кинетин (KIN), гиберелинска киселина (GA₃) и абсцисинска киселина (ABA).

1.3.1 Цитокинини

Цитокинини (Слика 7) су фитохормони укључени у регулацију деобе и диференцијације ћелија, формирање хлоропласта, иницијацију пупољака и одлагање сенесценције (Mok и Mok, 2001). Прве назнаке о повезаности цитокининских сигналних путева и метаболизма азота произилазе из опажања да је количина цитокинина у ткиву корелисана са доступношћу азота код јечма (Samuelson и Larsson, 1993) и дувана (Singh и сар., 1992), те да третман егзогеним цитокининма уклања инхибицију раста изазвану малом доступношћу азота код *Plantago major* (Kuiper, 1988). Повећана доступност азота доводи до повећања концентрације цитокинина у ксилемском соку код кукуруза (Takei и сар., 2001). Генетска позадина ових опажања постала је јаснија када је показано да нитрат индукује експресију *AtIPT3* гена (Слика 8) код *A. thaliana* (Takei и сар., 2004). Овај

ген кодира једну од седам изоформи ензима аденозин-фосфат-изопентенилтрансферазе (*IPT*) које каталишу иницијални корак у биосинтези цитокинина. Индукција експресије *AtIPT3* гена као одговор на повећану доступност нитрата делом је посредована *NRT1.1* протеином (Слика 8) који има улогу нитратног сензора (*Ho* и сар., 2009) и транспортера (*Wang* и сар., 2009). Експресија *AtIPT3* највиша је у флоемском ткиву што упућује да цитокинини синтетисани овим ензимом учествују у сигнализацији о азотном статусу из листа у корен (*Takei* и сар., 2004; *Kiba* и сар., 2011).

Једна од главних улога цитокинина у регулацији метаболизма азота је негативна регулација гена који кодирају активне транспортере за нитрат и амонијум-јон у корену. Код *A. thaliana* егзогена апликација цитокинина доводи до репресије гена који кодирају транспортере нитрата (*AtNRT2.1* и *AtNRT2.2*), транспортере амонијум-јона (*AtAMT1.1* - *1.3*), гена који кодира активни транспортер за уреу (*AtDUR3*) и неколико гена за транспортере аминокиселина (*Brenner* и сар., 2005; *Sakakibara* и сар., 2006). Сматра се да су хистидин киназе *AHK3* и *AHK4* рецептори цитокинина у корену који учествују у овој сигнализацији (Слика 8), пошто код *ahk3 ahk4* двоструког *knockout* мутанта *A. thaliana* не долази до репресије поменутих гена (*Higuchi* и сар., 2004). За разлику од ефеката у корену, цитокинини појачавају експресију неколико гена који кодирају нитратне транспортере у листу (*AtNRT1.4*, *AtNRT1.7* и *AtNRT2.7*) вероватно како би се побољшала дистрибуција и транслокација азота у листу у условима када је азот доступан у подлози (*Kiba* и сар., 2011).

1.3.2 Ауксини

Ауксини (Слика 7) се чине идеалним кандидатима за сигнализацију на даљину јер се примарно синтетишу у листу и транспортују базипетално у корен (*Berleth* и *Sachs*, 2001). Ауксини регулишу јако велики број физиолошких процеса као што су органогенеза, фототропизам и гравитропизам, и сматра се да је дистрибуција ауксина у биљци кључна детерминанта растења и развића. Поред транспорта флоемом ауксини се специјалним мембранским протеинима (*PIN*) координисано преносе између ћелија, а регулисана расподела ових ефлуксних

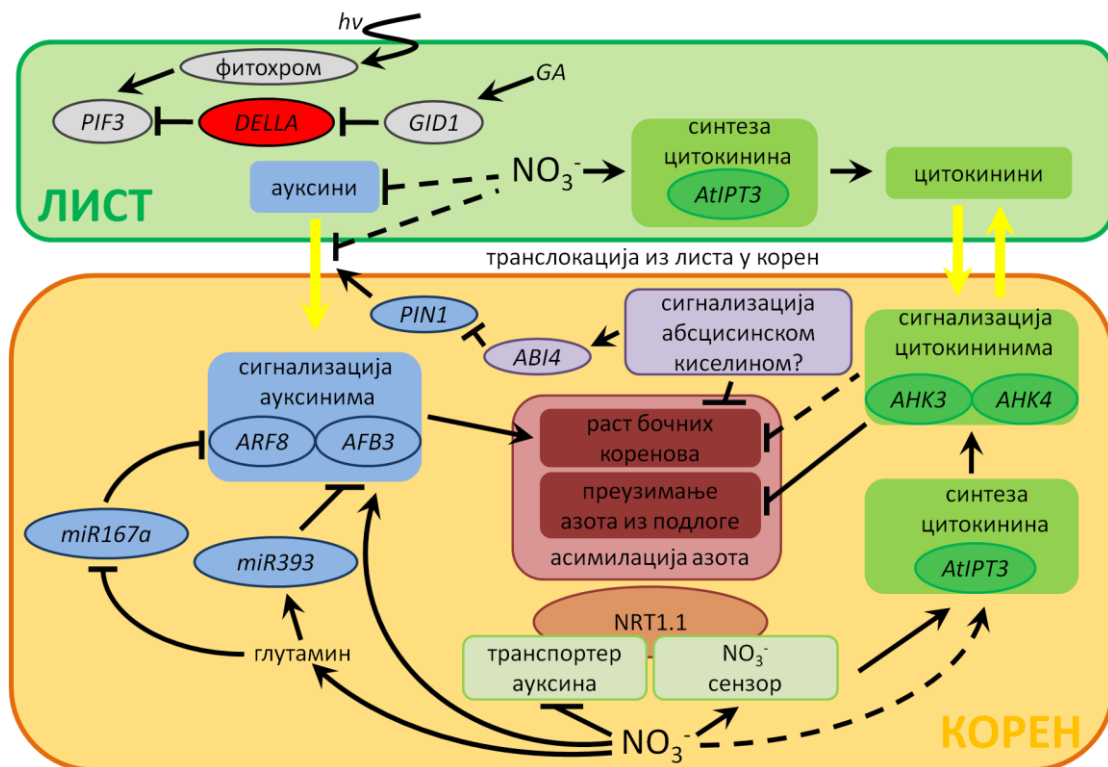
транспортера доводи до формирања концентрационих градијента ауксина у ткиву који обликују биљку (*Friml*, 2003). Укљученост у регулацију метаболизма азота постала је јасна када је показано да ауксини и нитрат имају исте ефекте на развој бочних коренова *A. thaliana*, а да ефекти апликације нитрата изостају код мутаната дефектних у ауксинској сигнализацији. Локално повећање концентрације нитрата у подлози доводи до иницијације и убрзава раст бочних коренова (*Robinson*, 1994), као и додатак егзогених ауксина (*Reed* и сар., 1998). Овај ефекат нитрата није примећен код мутанта *A. thaliana* неосетљивог на ауксине (*axr4*) који је дефектан у транспорту ових хормона између ћелија (*Zhang* и сар., 1999). За разлику од ефеката локалног повећања концентрације нитрата, продужена систематска апликација нитрата инхибира развој бочних коренова код *A. thaliana*. Код мутаната који су дефектни у нитрат-редуктази овај ефекат је израженији у односу на контролне биљке, што указује да повишена концентрација нитрата у ткиву, а не у подлози, доводи до инхибиције раста бочних коренова (*Zhang* и сар., 1999). Код дувана је показано да акумулација нитрата у листу доводи до инхибиције гранања корена (*Scheible* и сар., 1997). Ови подаци довели су до формирања модела према коме акумулација нитрата у листу инхибира синтезу или транспорт ауксина у корен (Слика 8), док их повећана концентрација нитрата у подлози у односу на ткиво поспешује (*Forde*, 2002a).

Експериментални докази све више упућују на кључну улогу микро РНК у регулацији експресије гена који омогућавају комуникацију између метаболизма азота и ауксинских сигнализационих путева. Недавно су идентификоване две микро РНК, *miR167a* (*Gifford* и сар., 2008) и *miR393* (*Vidal* и сар., 2010) чије је експресија регулисана концентрацијом глутаминских или других производа асимилације азота (Слика 8). Ове микро РНК хибридују са транскрипцима гена који кодирају медијаторе сигнализације ауксинима. Микро РНК *miR167a* доводи до репресије *ARF8*, протеина који је одговоран за пренос ауксинског сигнала приликом ремоделовања корена у одговору на нитрат (*Gifford* и сар., 2008). Нитрат индуцибилни рецептор ауксина *AFB3* је мета *miR393* (*Vidal* и сар., 2010). Интересантно је да *NRT1.1* протеин, за који се сматра да чини везу између метаболизма азота и цитокининских сигнализационих путева, такође има улогу и у ауксинској сигнализацији (Слика 8). Код мутанта *A. thaliana* са дефектним

NRT1.1 запажено је нагомилавање ауксина у ћелијама врха бочних коренова и индукције ремоделовања корена, што је навело ауторе да спекулишу о могућој улози *NRT1.1* у међућелијском транспорту ауксина (Krouk и сар., 2010).

1.3.3 Абсцисинска киселина

Абсцисинска киселина (*ABA*, Слика 7) је позната као хормон стреса који је укључен у регулацију физиолошких одговора на биотичке и абиотичке факторе, као и процеса који се одвијају током развића семена и успостављања дорманције (Seo и Koshiba, 2002). Улога *ABA*-е у регулацији метаболизма азота није до краја разјашњена, међутим ова област буди све више интересовања. Познато је да сигнализација *ABA*-ом учествује у инхибицији формирања бочних коренова *A. thaliana* у присуству високе концентрације нитрата у подлози (Signora и сар., 2001). Мутанти неосетљиви на *ABA*-у, са дефектним рецепторима (*abi4-1*, *abi4-2* и *abi5-1*) и мутанти дефектни у биосинтези (*aba1-1*, *aba2-3*, *aba2-4* и *aba3-2*), су мање сензитивни на инхибиторне ефекте продужене систематске апликације нитрата на развој бочних коренова. Показано је да *ABA* индукује експресију транскрипционог фактора *ABI4* у корену *A. thaliana*, који инхибира формирање бочних коренова највероватније спречавањем транспорта ауксина у корен (Слика 8). Трансгене биљке са конститутивном експресијом *ABI4* имале су значајно редуковане количине *PIN1* протеина који учествује у транспорту ауксина (Shkolnik-Inbar и Bar-Zvi, 2010).



Слика 8: Претпостављене интеракције између метаболичких путева асимилације азота и фитохормона. Доступност азота кроз концентрацију нитрата и низводних метаболита регулише биосинтезу цитокинина (посредством *AtIPT3*), перцепцију ауксина (преко *AFB3/miR393*), трансдукцију сигнала ауксина (преко *ARF8/miR167a*) и транспорт ауксина (*NRT1.1*). Абсцисинска киселина спречава транспорт ауксина у корен (*ABI4/PIN1*) и тиме инхибира њихове ефекте. Приказана је и улога гибберелина (GA) у светлосној регулацији експресије гена чији је медијатор фитохром (*GID1/DELLA/PIF3*). Црне стрелице означавају позитивне, а T- линије инхибиторне интеракције; испрекидане линије означавају непотврђене интеракције; жуте стрелице представљају транспорт хормона између листа и корена. *AtIPT3* - изоформа аденозин фосфат-изопентенилтрансферазе; *ANK3* и *ANK4* - рецептори за цитокине; *ARF8* - протеин који учествује у преносу ауксинских сигнала; *AFB3* - рецептор ауксина; *miR393* и *miR167a* - микро РНК које учествују у сигнализацији ауксинима; *NRT1.1* - протеин са двојном улогом сензора NO_3^- и транспортера ауксина; *ABI4* - транскрипциони фактор чије је експресија индукована абсцисинском киселином; *PIN1* - транспортер ауксина; *DELLA* - инхибитори одређених транскрипционих фактора; *PIF3* - транскрипциони фактор индукован активношћу фитохрома; *GID1* - рецептор гибберелина; $h\nu$ - светлост; GA -

гиберелини. Илустрација је модификована према Kiba и сар. (2011) уз коришћење података из Feng и сар. (2008) и Shkolnik-Inbar и Bar-Zvi (2010).

1.3.1 Гиберелини

Гиберелини (*GA*, Слика 7) регулишу бројне развојне процесе, од којих су најзначајнији цветање, сенесценција и клијање семена (*Brian*, 1959; *Yamaguchi*, 2008). До сада се мало зна о улози гиберелинске сигнализације у регулацији метаболизма азота. Примарно место синтезе *GA* су пластиди и већина изопренских јединица које улазе у састав ових молекула потиче из метилеритритол фосфатног пута (*MEP*) који је активан у пластидима (*Kasahara* и сар., 2002). Сматра се да се сигнализација са *GA* одвија кроз интеракцију са *DELLA* транскрипционим репресорима, односно да везивање гиберелина за рецепторе индукује каскаду која доводи до уклањања *DELLA* протеина убиквитинацијом и деградацијом у протеазому (*Itoh* и сар., 2003). *DELLA* протеини су репресори гена који кодирају протеине неопходне у путевима трансдукције светлосних сигнала посредованих фитохромом (*Davière* и сар., 2008). У недостатку *GA* одређени *DELLA* протеини се акумулирају у једру и интерагују са *PIF* (фитохром интерагујућим факторима) транскрипционим факторима онемогућавајући им да се вежу за промоторе циљаних гена чија је експресија регулисана светлошћу. Везивање *GA* за рецепторе *GID1* доводи до убиквитинације *DELLA* протеина и ослобађања *PIF* од негативне регулације (*Feng* и сар., 2008; Слика 8). О значају светлости у регулацији секундарне асимилације амонијум-јона насталих током фотореспирације у листовима дискутовано је раније, а пошто је показана интеракција између путева трансдукције сигнала *GA* и фитохрома, постоји могућност да су гиберелини такође укључени у овај процес.

1.4 Аналоги глутамата као инхибитори GS

Глутамин-синтетаза поседује три везивна места за супстрате, али је фокус досадашњих истраживања о GS инхибиторима био усмерен ка аминокиселинским аналозима који се везују уместо глутамата. Два најпознатија GS инхибитора су метионин-сулфоксимин и фосфинотрицин.

1.4.1 Метионин-сулфоксимин

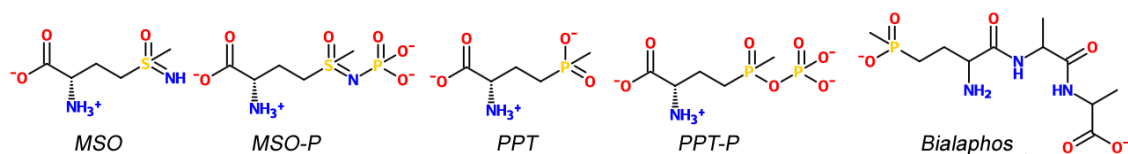
Сулфонатни аналог глутамата, метионин-сулфоксимин (*L*-*S*-(3-амино-3-карбокиспропил)-*S*-метилсулфоксимин, *MSO*, Слика 9) први је окарактерисани GS инхибитор (*Pace* и *McDermott*, 1952). *MSO* је компетитивни инхибитор *Glu*, док у присуству *ATP*-а, *MSO* постаје ирверзибилни инхибитор услед фосфорилације у активном месту при чему настаје метионин-сулфоксимин-фосфат (*MSO-P*, Слика 9) који „закључава” активни центар ензима (*Ronzio* и *Meister*, 1968; *Ronzio* и сар., 1969; *Rowe* и сар., 1969). Сви до сада откривени аналози глутамата који инхибирају GS имају сличан механизам везивања и инхибиције, а разлике између њих се огледају у другачијем афинитету активних центара за одговарајући фосфорилувани инхибитор (*Berlicki*, 2008).

1.4.2 Фосфинотрицин

Најпознатији GS инхибитор је фосфонатни аналог глутамата, фосфинотрицин (2-амино-4-(хидроксиметилфосфинил) бутаноат, *PPT*, Слика 9), који природно синтетишу стрептомиците *S. viridochromogenes* и *S. hygrosopicus* у облику нерибозомалног трипептида фосфинотрицил-*L*-аланил-*L*-аланина (Слика 9) комерцијално названог *Bialaphos* (*Bayer* и сар., 1972).

Слично као у случају *MSO* инхибиције, након иницијалног везивања које је компетитивно у односу на глутамат, ензим фосфорилује *PPT* при чему настаје фосфинотрицин-фосфат (*PPT-P*, Слика 9), који остаје ирверзибилно везан за активни центар (*Manderscheid* и *Wild*, 1986). Ензим није могуће реактивирати уклањањем слободног инхибитора, дијализом или гел-филтрацијом. Делимична

реактивација ензима остварена је у киселим пуферима високе јонске јачине, у којима је *PPT-P* хидролизовао на *PPT* и фосфат (*Colanduoni* и *Villafranca*, 1986).



Слика 9: Структуре *GS* инхибитора: метионин-сулфоксимин (*MSO*), метионин-сулфоксимин-фосфат (*MSO-P*), фосфинотрицин (*PPT*), фосфинотрицин-фосфат (*PPT-P*), фосфинотрицил-*L*-аланил-*L*-аланин (*Bialaphos*).

Фосфинотрицин је једини *GS* инхибитор који је пронашао примену као неселективни хербицид (комерцијална имена: *Basta*[®], *Liberty*[®], *Hoe39866*, *Bialophos*, *Buster*[®], *Rely*, *Finale* и *Challenge*). Комерцијалне формулације хербицида најчешће садрже рацемску смешу *L*- и *D*-фосфинотрицина у облику амонијумових соли, а ређе трипептид *Bialaphos*. Инхибиција биљне *GS* доводи до акумулације амонијака ослобођеног током фотореспирације у листовима и недостатка глутаминa и неколико других аминокиселина (*Tachibana* и сар., 1986a; *Tachibana* и сар., 1986b; *Hoerlein*, 1994). Повишена концентрација фотореспирационог амонијака доводи до нарушавања електрохемијских градијената у ћелији што инхибира фотосинтезу и фиксацију *CO*₂, а праћено је хлорозом, десикацијом и смрћу биљке (*Wendler* и сар., 1990; *Hoerlein*, 1994; *Evstigneeva* и сар., 2003). Коришћење *PPT*-а као хербицида је еколошки безбедно, јер се заостали фосфинотрицин релативно брзо уклања микроорганизмима присутним у земљишту (*Smith*, 1988).

Неколико врста микроорганизама способно је да детоксикује *PPT* ацетилацијом, захваљујући ензиму фосфинотрицин ацетил-трансферази (*PAT*). Ген који кодира *PAT* изолован је из *S. hygrosopicus* (*Thompson* и сар., 1987) и *S. viridochromogenes* (*Wohlleben* и сар., 1988) и назван „*bialaphos resistance gene*” (*bar*). Трансгене биљке резистентне на *PPT* произведене су трансформацијом са *Agrobacterium* који је садржао *bar* ген у Т-ДНК (*Block* и сар., 1987). Сем што омогућава једноставну контролу корова у подручјима где се гаје трансгене биљке

које носе *bar*, овај ген се често употребљава као селективни маркер у протоколима за генетске трансформације (White и сар., 1990).

1.5 Хормеза

Хормеза је термин којим се описују позитивни биолошки ефекти проузроковани ниским дозама токсичних супстанци или других фактора стреса. У токсикологији овај феномен карактерише стимулација малим, а инхибиција високим концентрацијама неке супстанце, што производи нелинеарни одговор у функцији концентрације. Према *Calabrese* и *Baldwin* (2002), на основу механизма деловања односно природе хорметичког одговора, издвајају се два типа оваквих ефеката, директна стимулација (*direct stimulation hormesis* - *DSH*) и стимулација превеликом компензацијом (*overcompensation stimulation hormesis* - *OCSH*). *OCSH* обухвата све феномене при којима одговор организма на иницијалну хомеостатску неравнотежу изазвану малим дозама неког токсина или других фактора стреса, доводи до позитивних промена које не би биле детектоване у одсуству иницијалног стреса. Пример *OCSH* представља оксидативни стрес проузрокован физичком активношћу. Индивиде са мало, односно јако пуно физичке активности трпе висок оксидативни стрес у ткиву, док умерена и редовна физичка активност смањује ниво оксидативног стреса којем је организам изложен, што има позитивне ефекте на кардиоваскуларни и нервни систем и имунитет услед модулације редокс хомеостазе (*Radak* и сар., 2008). Са друге стране, *DSH* представља директну стимулацију неког процеса при малим дозама неке супстанце, а инхибицију при већим.

Херметички ефекти су описани на различитим модел-системима и са различитим агенсима (*Calabrese* и *Baldwin*, 2001) укључујући и хербициде (*Evstigneeva* и сар., 2003; *Cedergreen*, 2008; *Velini* и сар., 2010).

1.5.1 Хорметички ефекти хербицида

Стимулација раста биљака малим дозама токсичних супстанци није нова идеја. Један од првих селективних хербицида 2-метил-4-хлорфеноксиацетат је развијен у циљу побољшања приноса житарица (*Cedergreen* и сар., 2007). Једна од

првих студија која се бавила пручавањем хормезе индуковане хербицидима показала је да третман биљака сублеталним дозама неколико хербицида, инхибитора фотосистема II, доводи до стимулације раста корена и повећања суве масе код краставца и овса (*Wiedman и Appleby, 1972*). Опажена стимулација раста није могла бити објашњена променама у респирацији, садржају протеина, аминокиселина или угљених хидрата. Третман семена пшенице, соје, ротквице и кукуруза ниским концентрацијама напропамида, хербицида који инхибира синтезу нуклеинских киселина, изазвао је повећање свеже и суве масе и убрзан раст листова (*Devlin и сар., 1982*). Услед потешкоћа у одређивању стимулаторних доза хербицида код различитих биљних врста и у различитим условима гајења, као и недостатка знања о потенцијалним механизмима којима би се објаснила дата стимулација раста, до сада је мало пажње поклоњено овом феномену. Данас, када увиђамо бројна ограничења одрживог раста производње хране за све многобројнију популацију на Земљи, враћа се интересовање за јефтиније начине производње, којима би се побољшао принос пољопривредних култура. Због тога стимулаторни ефекти хербицида на раст и принос пољопривредних култура побуђују све већу заинтересованост, а у случају одређених хербицида може доћи и до промене тежишта примене са сузбијања корова на побољшање приноса усева (*Belz и сар., 2011*). Опсежна студија о ефектима девет хербицида и једног фунгицида, различитих механизма деловања, на параметре раста четири биљне врсте (*L. minor, P. subcapitata, T. inodorum и S. media*), показала је да 25 – 75 % добијених зависности има хорметичке одлике (*Cedergreen и сар., 2007*). Неколико публикација доводи *PPT* у везу са различитим стимулаторним ефектима на раст и морфогенезу различитих биљних врста. Субтоксичне концентрације *PPT*-а стимулишу регенерацију листова из трансгених коренова *Antirrhinum majus* (*Hoshino и Mii, 1998*), регенерацију биљака из калуса гладиола (*Kato и van Eck, 1997*), соматску ембриогенезу калуса грожђа (*Hébert-Soulé и сар., 1995*) и повећавају принос неких житарица (*Evstigneeva и сар., 2003*). Предложено је да се у ниским концентрацијама *PPT* везује за алостерична места на ензиму што доводи до активације *GS* која је опажена у сировим протеинским екстрактима биљака у присуству *PPT*-а (*Evstigneeva и сар., 2003*).

1.6 Општи подаци о проучаваним врстама

1.6.1 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana (Слика 10А) је мала зељаста биљка из фамилије *Brassicaceae*, која укључује и култивисане врсте као што су купус и ротква. Таксономска класификација *A. thaliana* дата је у табели 3. *A. thaliana* нема агрономски значај, међутим ова врста има неколико особина захваљујући којима представља једну од најпроучаванијих биљака у основним истраживањима физиологије, генетике, молекуларне биологије и биохемије. *A. thaliana* се лако узгаја и има кратак животни циклус (од клијања до плодношења) који траје од 6 до 9 недеља. Мали геном од 125 Mb, први је биљни секвенцирани геном (*TheArabidopsisGenomeInitiative*, 2000). Од секвенцирања генома до данас формиране су опширне базе података које обухватају описе генске структуре, продуката гена и њихове функције, затим податке о експресији гена, метаболизму, генским и физичким маркерима, као и о различитим мутантним линијама. Поред података, научној јавности доступна је и база семена различитих мутантних линија. Због наведених разлога врста *A. thaliana* је омиљена међу научницима, а велики број сазнања о молекулским механизмима специфичним за биљке потиче од експеримента на овом неугледном корову.

Табела 3: Таксономска класификација *A. thaliana* и звездана:

	<i>A. thaliana</i>	звездан
царство (<i>regnum</i>)	<i>Plantae</i>	
субцарство (<i>subregnum</i>)	<i>Tracheobionta</i> (васкуларне биљке)	
надтип (<i>superphylum</i>)	<i>Spermatophyta</i> (биљке које доносе семена)	
тип (<i>phylum</i>)	<i>Magnoliophyta</i> (биљке које цветају)	
класа (<i>classis</i>)	<i>Magnoliopsida</i> (дикотиледоне биљке)	
поткласа (<i>subclassis</i>)	<i>Dilleniidae</i>	<i>Rosidae</i>
ред (<i>ordo</i>)	<i>Capparales</i>	<i>Fabales</i>
фамилија (<i>familia</i>)	<i>Brassicaceae</i>	<i>Fabaceae</i>
род (<i>genus</i>)	<i>Arabidopsis</i> Heynh.	<i>Lotus</i> L.
врста (<i>species</i>)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	<i>Lotus corniculatus</i> L.

1.6.1.1 Т-ДНК инсерционе библиотеке *A. thaliana*

Чест приступ за утврђивање улога одређеног гена у организму је поређење мутаната код којих је тај ген нефункционалан (*knockout* мутанти) са дивљим типом (*wild type*, *wt*) исте или сличне генетске позадине. Генерисање *knockout* (*ko*) мутаната може бити циљано и насумично. Циљана мутагенеза *in vivo* подразумева физичку елиминацију функционалног гена или дела гена и његову замену нефункционалном варијантом у живом организму или ћелијској култури. Овакав приступ се у суштини заснива на циљању гена хомологом рекомбинацијом *in situ* и развијен је првенствено за сисарске моделе (мишеве и пацове), али је подједнако применљив и на биљке. Насумична мутагенеза *in vivo* подразумева мутирање целог генома инсерцијама или хемијским агенсима, са циљем прављења библиотека мутаната које се користе за идентификацију нових гена преко мутантних фенотипова и за генетичке анализе (*Simonović*, 2011).

Нешто детаљније ће бити поменути два пројекта формирања библиотека *knockout* мутаната *A. thaliana*: „*The Syngenta Arabidopsis Insertion Library*” - *SAIL* (*McElver* и сар., 2001; *Sessions* и сар., 2002) и „*The Salk Institute sequence-indexed library of insertion mutations in the arabidopsis genome*” - *SALK* (*Alonso* и сар., 2003), који су направили револуцију у функционалној геномици, а неколико мутантних линија које су резултат ових пројеката коришћено је и у овом раду. Током *SALK* и *SAIL* пројеката генерисано је по 100000 различитих Т-ДНК инсерционих линија *A. thaliana*. У већини инсерционих линија одређен је положај једне инсерције у геному секвенцирањем око Т-ДНК, при чему је показано да је учесталост Т-ДНК инсерција од 1,5 - 2 по генерисаној мутантној линији. За генерисање *SAIL* линија коришћена је инфилтрација са *A. tumefaciens* који је носио вектор *pDAP101* (Т-ДНК дужине 4763 *bp*) или *pCSA110* (Т-ДНК дужине 7541 *bp*), који су садржали *bar* ген као селектабилни маркер. *SALK* инсерционе линије су добијене инфилтрацијом са *A. tumefaciens* који је носио *pROK2* вектор (Т-ДНК дужине 4393 *bp*) који садржи *nptII* ген (кодира неомицин-фосфотрансферазу) као селектабилни маркер. Тренутно је доступно око 54000 *SAIL* и око 45000 *SALK* мутантних линија, од којих је већина хетерозиготна за Т-ДНК инсерцију. Ове базе су значајан ресурс у испитивањима функције гена код биљака, а сложени

експерименти са вишеструким мутантима могу довести до базичних сазнања у биљној биохемији и физиологији.



Слика 10: Изглед проучаваних биљака у природи. А - *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh; фотомограф: Kurt Stepnitz (<http://msutoday.msu.edu/>). Б - *Lotus corniculatus* L. фотомограф: Paul L. Redfearn, Jr. (<http://biology.missouristate.edu/>).

1.6.2 *Lotus corniculatus*

L. corniculatus L. (звездан, Слика 10Б) је вишегодишња тетраплоидна ($2n=4x=24$) легуминоза, чија је таксономска класификација дата у табели 3. Сматра се да је ова врста настала хибридизацијом два блиска диплоидна претка, највероватније *L. tenuis* и *L. uliginosus* (Gauthier и сар., 1997). Генерално, врсте које припадају роду *Lotus* су због адаптабилности и више хранљиве вредности у односу на белу детелину (*Trifolium repens*) и луцерку (*Medicago sativa*) врло значајне у производњи сточне хране (Escaray и сар., 2012). Једна од занимљивих предности рода *Lotus* у односу на остале легуминозе је синтеза и акумулација проантоцијанидина (кондензовани танини) у листовима. Кондензовани танини смањују ферментацију протеина у румену преживара, и на тај начин побољшавају варење протеина и апсорпцију аминокиселина, умањују надимање и емисију амонијака и метана (Aerts и сар., 1999). Региони у којима се експлоатишу врсте рода *Lotus* су Јужна Америка са посејаних 1,85 милиона *ha*, Северна Америка са 1,39 милиона *ha* и Европа са 1,38 милиона *ha* (Díaz и сар., 2005). Занимљиво је да је на светском нивоу 90 % површине засејане врстама из рода *Lotus* ограничено на

само 10 земаља, а од тога *L. corniculatus* окупира 90 %. Годишњи приноси *L. corniculatus* на пољопривредним земљиштима варирају од 8 000 до 10 000 kg суве масе по хектару, што је око 50 - 80 % приноса луцерке.

Захваљујући ендосимбиотским азотофиксаторима из рода *Rhizobium* и арбускуларној микоризи, односно симбиотским асоцијацијама са гљивама из рода *Glomeromycota*, легуминозе добро опстају на сиромашним земљиштима (*Escaray* и сар., 2012). Код звездана је ова одлика појачана великим генотипским диверзитетом проузрокованим лакоћом укрштања и хибридизације различитих сорти (*Steiner* и *de los Santos*, 2001). Пластичност проузрокована фенотипским и генотипским диверзитетом, као и симбиотским односима, омогућава овој врсти широку распрострањеност. Адаптивне карактеристике звездана чине га добрим кандидатом за фиторемедијацију сиромашних земљишта, земљишта контаминираних тешким металима и солана (*Escaray* и сар., 2012).

2. Циљ рада

Основни циљеви истраживања докторске дисертације су:

1. Развој протокола за екстракцију *GS* протеина са нативних гелова након детекције ензимске активности.
2. Испитивање утицаја биљних регулатора растења на експресију гена *GS-GOGAT* циклуса код *A. thaliana*.
3. Испитивање могућности компензације недостатка појединих *GS1* изоформи код Т-ДНК инсерционих *knockout* мутаната *A. thaliana* регулацијом експресије осталих изоформи.
4. Одређивање субјединичног састава *GS1* декамера *A. thaliana* коришћењем Т-ДНК инсерционих *knockout* мутаната.
5. Механистичко објашњење хорметичког ефекта инхибитора *GS*, фосфинотрицина, код *L. corniculatus* L. као модел-биљке.

3. Материјал и методе

3.1 Биљни материјал

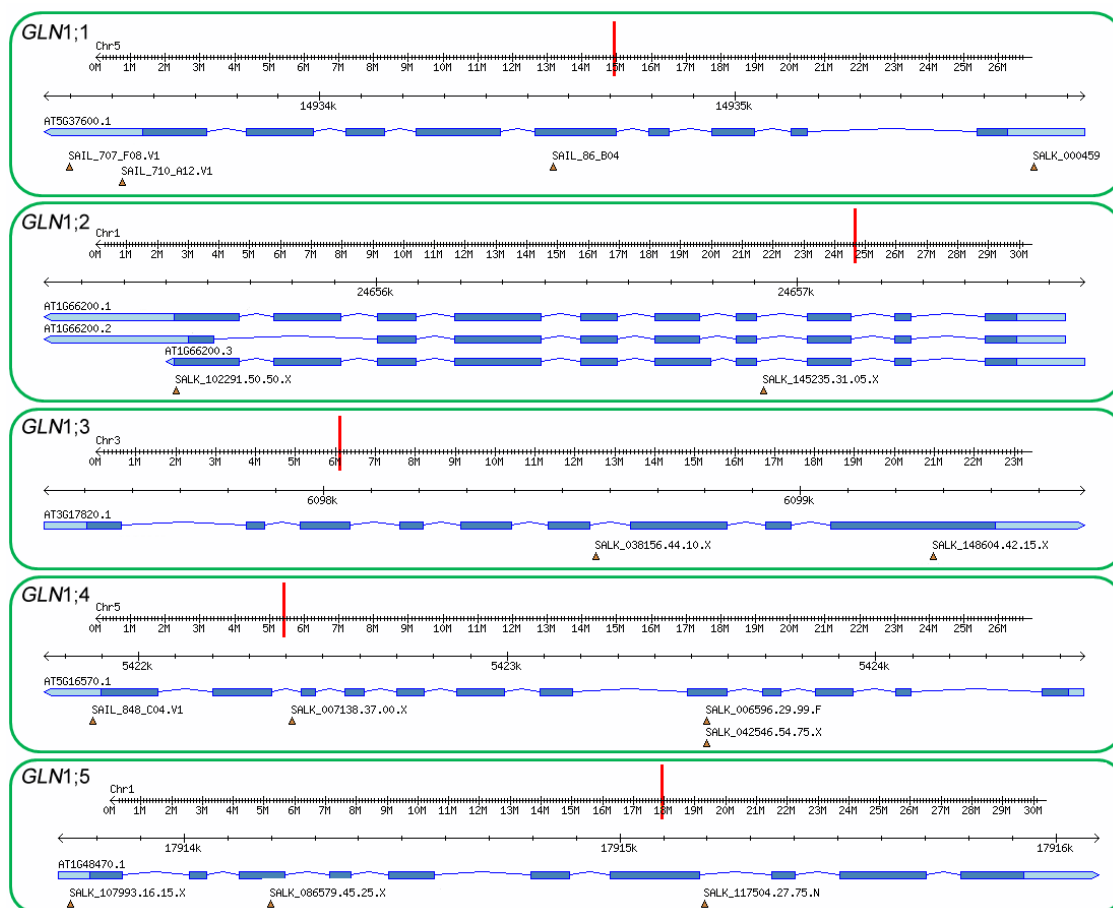
За испитивање изоформских профила и експресије *GS* у различитим ткивима и при различитим условима гајења *A. thaliana*, као и за испитивање регулације експресије *GS* гена биљним регулаторима растења коришћена је *N60000* линија (*NASC ID*) дивљег типа *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., екотип *Columbia* (*Col-0*).

У циљу добијања *knockout* мутаната *A. thaliana* у *GS1* генима, набављене су Т-ДНК инсерционе линије са *Col-0* генетском позадином наведене у табели 4. Семена су наручена из "The Nottingham Arabidopsis Stock Centre" (*NASC*).

Табела 4: Коришћене Т-ДНК инсерционе линије са инсерцијом у *GS* генима:

ген	инсерциона линија	<i>NASC ID</i>	позиција инсерције	интерна ознака
GLN1;1	<i>SALK_000459C</i>	<i>N667651</i>	5'-utr/егзон 1	11A
	<i>SAIL_707_F08</i>	<i>N831273</i>	3'-utr/егзон 9	11B
	<i>SAIL_710_A12</i>	<i>N831427</i>	3'-utr/егзон 9	11C
	<i>SAIL_86_B04</i>	<i>N870927</i>	егзон 5	11D
GLN1;2	<i>SALK_003343C</i>	<i>N667678</i>	промотор	12A
	<i>SAIL_613_E02</i>	<i>N826275</i>	промотор	12B
	<i>SALK_102291</i>	<i>N602291</i>	егзон 10	12C
	<i>SALK_145235C</i>	<i>N679204</i>	интрон 3	12D
GLN1;3	<i>SALK_074402C</i>	<i>N671545</i>	промотор	13A
	<i>SALK_038156C</i>	<i>N670563</i>	интрон 6	13B
	<i>SALK_128612C</i>	<i>N672077</i>	промотор	13C
	<i>SALK_148604C</i>	<i>N669232</i>	егзон 9	13D
GLN1;4	<i>SALK_007138C</i>	<i>N673737</i>	интрон 10	14A
	<i>SAIL_848_C04</i>	<i>N837891</i>	3'-utr/егзон 12	14B
	<i>SALK_006596</i>	<i>N506596</i>	егзон 5	14C
	<i>SALK_042546C</i>	<i>N662238</i>	егзон 5	14D
GLN1;5	<i>SALK_086579C</i>	<i>N660998</i>	егзон 3	15A
	<i>SALK_039520</i>	<i>N539520</i>	промотор	15B
	<i>SALK_107993</i>	<i>N607993</i>	5'-utr/егзон 1	15C
	<i>SALK_117504C</i>	<i>N676635</i>	интрон 7	15D

Инсерционе линије са *C* на крају кода (Табела 4) су хомозиготи за Т-ДНК инсерцију. Позиција Т-ДНК инсерција у *GS* генима код различитих линија приказана је на слици 11.



Слика 11: Гени који кодирају цитосолне *GS* код *A. thaliana*. Приказана је: позиција и оријентација на хромозому; структура гена са интронима, егзонима и 3'- и 5'- UTR регионима (за *GLN1;2* ген предложена су три модела иРНК); позиција Т-ДНК инсерционих секвенци у генима код наручених мутантних линија (нису приказане Т-ДНК инсерције у промоторима).

За испитивање ефекта фосфинотрицина на раст биљака и активност и мобилност *GS* изоформи код *L. corniculatus*, коришћен је варијетет *L. corniculatus* L. cv. Vokog (*Mijatović* и сар., 1986) који је претходно уведен у *in vitro* културу (*Nikolić* и сар., 1997).

За оптимизацију екстракције *GS* изоформи након нативне електрофорезе у циљу даље анализе денатуришућом електрофорезом и *western blot*-ом коришћен је спанаћ (*Spinacia oleracea*) купљен на локалној пијаци.

3.2 Услови гајења биљака

3.2.1 Раст Т1 генерације мутантних линија *A. thaliana*

Како би се добила довољна количина мутантних семена *A. thaliana* за експерименте, 4 до 6 семена по линији је остављено да имбибује у стерилној дестилованој води 48 *h* на 4 °C. Имбибована семена посејана су у пластичне саксије испуњене земљом (стандардна мешавина 60 % (*v/v*) тресета, 20 % кварцног песка и 20 % глистењака), која је претходно засићена водом. Биљке су расле у соби за гајење, под условима дугог дана (16 *h* светла, праћено са 8 *h* мрака), при константној температури 23 ± 2 °C и релативној влажности 20 – 30 %. Беле флуоресцентне лампе (Тесла, Панчево, Србија) коришћене за осветљење производе су флукс фотона од $32,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ на нивоу биљака. Прве две недеље саксије су покривене прозирном пластичном фолијом, како би се одржала висока влажност. Биљке су заливане по потреби, а откривене су када су развиле розете. Саксије су раздвојене прозирном фолијом како би се спречила унакрсна полинација између линија. У наредна два до четири месеца све линије су развиле љуске, које су по достизању зрелости сакупљене са биљака и чуване у стакленим петријевим шољама. Семена су издвојена из љуски и чувана у мраку на собној температури у пластичним тубама (Т1 генерација).

У циљу добијања биљног материјала за селекцију инсерционих хомозигота РНК маркерима, део семена Т1 генерације свих мутантних линија такође је посејан у саксије са земљом и гајен на исти начин.

3.2.2 Успостављање *in vitro* културе и раст биљака *A. thaliana* на течној подлози

За потребе испитивања експресије *GS* гена и електрофоретских профила *GS* изоформи у различитим ткивима, као и за испитивање утицаја биљних регулатора растења на експресију *GS* и *GOGAT* гена, биљке су гајене *in vitro* у

течној *MS* подлози која се састојала од основног штока соли и витамина (*Murashige* и *Skoog*, 1962), 3 % сахарозе и 0,7 % агара (Табела 5).

Семена су стерилисана три пута по 30 *s* раствором који је садржао 10 % (*v/v*) варикине и 90 % (*v/v*) етанола, а затим су испрана три пута по 30 *s* са стерилном дејонизованом водом и остављена да имбибују у стерилним микротубама 48 *h* на 4 °C. Након стратификације семена су пребачена у течни *MS* (*Murashige* и *Skoog*, 1962) базални медијум (Табела 5) коме је *pH* подешен на 5,8 пре аутоклавирања на 114 °C током 25 минута. Биљке су гајене у условима кратког дана (8 *h* светла праћено са 16 *h* мрака), при температури од 23 ± 2 °C, релативној влажности 60 – 70 % и флуксу фотона од 8-10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ на нивоу биљака. Културе су држане на клацкалицы која је радила брзином од око 20 *Hz*, чиме је обезбеђена неопходна аерација течне подлоге. Након четири недеље раста, биљни материјал (одвојени коренови и листови) је замрзнут у течном азоту и чуван на -80 °C до екстракције укупних протеина и РНК, или су биљке третиране регулаторима растења (Поглавље 3.2.2.1).

3.2.2.1 Третман биљним регулаторима растења

Четири недеље старе биљке гајене у стакленим ерленмајерима на течној *MS* подлози су у стерилним условима оцеђене од заосталог медијума на филтер папиру. Ове биљке су потом распоређене у свеже направљене течне *MS* подлоге са варирајућим концентрацијама (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} *M*) четири регулатора растења: *ABA*, *KIN*, *GA3* и *2,4-D*. Контролна група биљака пребачена је на свежу течну *MS* подлогу без додатка регулатора растења. За сваки третман постављено је по три реплика од по десет биљака. Биљни материјал (одвојени листови и коренови) прикупљен је 24 *h* након третмана, замрзнут у течном азоту и чуван на -80 °C до екстракције РНК и укупних слободних аминокиселина.

Табела 5: Састав *MS* и *MS*^{1/2} (Murashige и Skoog, 1962) базалних хранљивих подлога:

једињење		<i>MS</i> базална подлога [<i>mg</i> · <i>l</i> ⁻¹]	<i>MS</i> ^{1/2} базална подлога [<i>mg</i> · <i>l</i> ⁻¹]
макро- елементи	NH ₄ NO ₃	1650	825
	KNO ₃	1900	950
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	220
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	185
	KH ₂ PO ₄	170	85
микро- елементи	MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3	11,15
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6	4,3
	H ₃ BO ₃	6,2	3,1
	KI	0,83	0,415
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	0,125
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	0,0125
	CoCl ₂ x 2H ₂ O	0,025	0,0125
	Fe (III) Na-EDTA	36,7	36,7
витамини	ниацин	0,5	0,25
	витамин Б6	0,5	0,25
	витамин Б1	0,1	0,05
додачи	глицин	2	1
	миоинозитол	100	100
	сахароза	30000	30000
	агар ¹	7000	7000
<i>pH</i>	-	5,8	5,8

Напомена:

¹агар се додаје само у случају припремања чврстог медијума

3.2.3 Раст биљака *A. thaliana* на чврстој подлози

У циљу испитивања електрофоретских профила *GS* изоформи у различитим ткивима код *wt* биљака, као и за селекцију хомозиготних инсерционих мутаната ДНК маркерима, односно гајењем на селективним подлогама, биљке су гајене у *in vitro* култури на чврстом медијуму.

Имбирована и стерилисана семена су након стратификације засејана на чврсту *MS*^{1/2} базалну хранљиву подлогу (Табела 5). Биљке су гајене у условима дугог дана (16 *h* светла праћено са 8 *h* мрака), при температури од 25 ± 2 °C,

релативној влажности 60 – 70 % и флуксу фотона од $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ у нивоу биљака.

За потребе испитивања електрофоретских профила *GS* изоформи, четири недеље старим биљкама раздвојени су коренови и листови, замрзнути у течном азоту и чувани на $-80\text{ }^\circ\text{C}$ да би касније били коришћени за екстракцију укупних протеина. Свежи листови коришћени су за изолацију хлоропласта.

Током иницијалних експеримената селекције, две недеље старе биљке T1 генерације мутаната који су били потомство хетерозиготних T-ДНК инсерционих линија (Табела 4), пребачене су на свеже $MS\frac{1}{2}$ хранљиве подлоге којима је додато $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ канамицина у случају *SALK* линија, односно $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ фосфинотрицина у случају *SAIL* линија, како би се одвојило хетерозиготно и потенцијално хомозиготно потомство од *wt* потомства.

За потребе селекције T-ДНК инсерционих мутаната ДНК маркерима, две недеље стари клијанци T1 генерације мутаната су пребачени на свежу $MS\frac{1}{2}$ хранљиву подлогу и гајени у пластичним посудама (*Magenta*[™] *vessel*, #V8505, *Sigma-Aldrich*, *St. Louis*, САД). Приликом пребацивања, из розете сваке биљке откинут је мањи лист, замрзнут у течном азоту и чуван на $-80\text{ }^\circ\text{C}$ до изолације ДНК. Потврђени хомозиготи су остављени да плодносе и сакупљена је T2 генерација семена.

За испитивање експресије *GS* гена и електрофоретских профила *GS* изоформи код изолованих *GS knockout* мутаната коришћени су цели, две недеље стари клијанци.

3.2.4 Култура калуса *A. thaliana*

За успостављање културе калуса, клијанци *A. thaliana* су гајени две недеље на чврстој $MS\frac{1}{2}$ базалној хранљивој подлози (поглавље 3.2.3). Након тога коренови су исечени на сегменте дужине 3 - 5 *mm*, и постављени пет дана на чврсту $MS\frac{1}{2}$ базалну хранљиву подлогу (Табела 5) којој је додато $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2,4-*D*

ради индукције калуса. Калуси су даље пропагирани на чврстој $MS\frac{1}{2}$ базалној хранљивој подлози уз додатак $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2,4-D и $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KIN.

3.2.5 *In vitro* култура звездана и третман BASTA[®]-ом

Изданци *L. corniculatus* L. св. Вокор, гајени су *in vitro* у теглама од 360 ml на 60 ml чврсте MS базалне подлоге (Табела 5). Културе су гајене у условима дугог дана (16 h фотопериод), на температури од 25 ± 2 °C, релативне влажности унутар тегли од ≈ 70 % и флуксу фотона од $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ у нивоу биљака. Три недеље стари изданци коришћени су за одржавање културе, третман BASTA[®]-ом, изолацију протеина и хлоропласта.

Да би се испитао ефекат ниских концентрација PPT-а на раст *L. corniculatus*, три недеље старим изданцима је измерена маса, а потом су 5 минута умочени у серијска разблажења BASTA[®]-е у води, која су садржала 1, 12,5, 25, 50, 100 и 200 μM PPT-а. Контролне биљке су умочене у стерилну дејонизовану воду. Сви изданци су били приближне масе и насумично су груписани у третмане. Коришћено је десет биљака по третману, пет по тегли. Након третмана хербицидом, изданци су постављени на свежу MS базалну подлогу и остављени да расту 15 дана, након чега им је измерена маса. Прираст биомасе одређен је као разлика масе изданака 15 дана након третмана и масе пре третмана хербицидом.

3.3 Изолација РНК тризолом

Тризолом је изолована РНК из *wt* биљака *A. thaliana* са циљем испитивања експресије *GS* гена у различитим ткивима и регулације експресије *GS* и *GOGAT* гена биљним регулаторима растења. РНК је изолована по упутству произвођача TRIzol реагенса (*Invitrogen, Carlsbad, CA, САД*). Тризол реагенс је припреман у лабораторији.

Све изолације су изведене у стерилним условима. Коришћене су "RNase-free" микротубе и наставци. Дејонизована вода коришћена за припрему раствора третирана је 0,05 % (v/v) диетилпирокарбонатом (DEPC), иреверзибилним инхибитором рибонуклеаза. Авани, тучкови и када за електрофорезу су третирани

30 минута са 3 % водоник пероксидом. Авани, тучкови и сви раствори сем фенола су аутоклавирани на 114 °C током 25 минута.

Биљни материјал је хомогенизован у течном азоту помоћу авана и тучка. На сваких 200 - 400 mg спрашеног ткива додат је 1 ml тризола (0.8 M гуанидин-тиоцијанат, 0.4 M амонијум-тиоцијанат, 0.1 M натријум-ацетат, pH 5,0, 5 % (v/v) глицерол и 38 % (v/v) фенол еквилибрисан у *Tris-HCl* пуферу, pH 8, у *DEPC* третираној дејонизованој води) и хомогенизација је настављена до отапања. Хомогенати су потом пребачени у стерилне микротубе (*RNase-free, Eppendorf, Hamburg*, Немачка) и додато им је по 200 μ l раствора хлороформ-изоамил алкохол (24:1, v/v). Узорци су вортексовани 20 s и инкубирани 3 минута на собној температури. Фазе су раздвојене центрифугирањем током 10 минута на 12000 g. Супернатант је одливен у нов сет микротуба, и узорцима је додато по 250 μ l изопропанола и 250 μ l раствора за преципитацију РНК (0.4 M NaCl, 0.8 M натријум-цитрат, 0.8 M HCl у *DEPC* третираној води). Узорци су затим вортексовани 5 s, инкубирани 30 мин на -20 °C ради преципитације РНК, а затим центрифугирани 10 минута на 12000 g и 4 °C. Супернатант је одбачен, а преципитат испран са 1 ml 75 % етанола. Након 10 минута центрифугирања (7000 g на 4 °C), етанол је одбачен, а преципитат осушен у ламинату под струјом стерилног ваздуха и, у зависности од количине, растворен у 30 - 60 μ l *DEPC* воде. Квалитет РНК је проверен електрофорезом на 1,5 % агарозним геловима, а потврда квалитета и концентрација РНК је одређена спектрофотометријски (спектрофотометар: *Agilent 8453, Agilent Technologies, Waldbronn*, Немачка), после разблажења 1:100 у 10 mM *Tris-HCl* пуферу, pH 7,5. Квалитет РНК је одређен на основу односа апсорбанци узорака 260 nm/280 nm, при чему су прихватљиве вредности биле од 1,8-2,1. Концентрација РНК је одређена на основу апсорбанције на 260 nm, формулом:

$$\text{РНК концентрација } [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] = A_{260} \cdot 40 \cdot 100 \text{ (фактор разблажења)}$$

пошто средњи екстинкциони коефицијент за једноланчану РНК износи 0.025 ($\mu\text{g}/\text{ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (*Sambrook и Green, 2012*). Узорци РНК су чувани на -80 °C до тренутка коришћења.

3.4 Изолација РНК помоћу помоћу *Spectrum™ Plant Total RNA Kit*-а

За изолацију РНК из потврђених хомозиготних мутаната коришћен је *Spectrum™ Plant Total RNA Kit* (#STRN250, Sigma-Aldrich) комплет уместо протокола са Тризолом, јер омогућава екстракцију РНК из малих узорака ткива.

За хомогенизацију је коришћено 50-100 mg биљног материјала који је претходно узоркован и чуван на -80 °C. Залеђено ткиво је хомогенизовано 10 s стерилним пластичним тучковима који су претходно охлађени течним азотом. Сваком узорку је потом додато 500 μ l раствора за лизу (*lysis solution*). Узорци су вортексовани 30 s, икубирани 5 минута у воденом купатилу на 56 °C и центрифугирани 3 минута на 15000 g како би се сталожили нерастворни ћелијски фрагменти. Добијени супернатанти су нанесени на филтрационе колоне (*filtration column*) које су затим центрифугиране 1 минут на 15000 g. Филтрирани лизати су затим помешани са по 500 μ l везивног раствора (*binding solution*) и то је нанесено на везивне колоне (*binding column*) које су потом центрифугиране 1 минут на 15000 g. Филтрати су одбачени и на колоне је додато 500 μ l раствора за испирање 1 (*wash solution 1*). Након центрифугирања од 1 минут на 15000 g филтрат је одбачен, а колоне два пута испране са по 500 μ l раствора за испирање 2 (*wash solution 2 concentrate*, разблажен са четири запремине апсолутног етанола) и осушене додатним центрифугирањем од 1 минут при 15000 g. Филтрати су одбачени, а везана РНК је са колоне елуирана са 50 μ l елуционог раствора (*elution solution*) и квантификована као што је раније описано (поглавље 3.3).

3.5 Изолација ДНК *mini-prep* СТАВ методом

Геномска ДНК изолована је модификованом СТАВ методом (Haymes, 1996) која омогућава изолацију квалитетне ДНК из мале количине биљног материјала. По узорку је за изолацију коришћено око 10 mg биљног материјала (један лист *A. thaliana*), који је претходно узоркован и замрзнут на -80 °C у пластичним микротубама од 1.5 ml. Залеђен биљни материјал је хомогенизован 10 s пластичним тучковима који су претходно охлађени урањањем у течни азот. Сваком узорку је потом додато 400 μ l изолационог пуфера (100 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM Na-EDTA, 1,4 M NaCl, 1 % (w/v) поливинилпиролон, 2 % (w/v)

цетилтриметиламонијум-бромид и 0,1 % (v/v) β -меркаптоетанол) и хомогенизација је настављена 5 s, након чега су узорци држани на леду до комплетирања свих хомогенизација. Узорци су затим вортексовани 10 s и инкубирани 60 минута у воденом купатилу на 60 °C. Након инкубације сваком узорку је додато по 400 μ l раствора хлороформ-изоамил алкохол (24:1 v/v) и узорци су вортексовани 30 s, центрифугирани 5 минута на 15000 g, након чега су горње, водене фазе (250-300 μ l), пребачене у нови сет стерилних микротуба. Преципитација ДНК изведена је додавањем 600 μ l охлађеног апсолутног етанола и хлађењем узорака у току 30 минута на -20 °C. Узорци су потом центрифугирани 10 минута на 15000 g, на 4 °C. Супернатант је одбачен, а ДНК преципитат испран са 100 μ l 70 % етанола. Након кратког центрифугирања од 30 s, етанол је одбачен, а преципитат осушен у ламинату под струјом стерилног ваздуха и растворен у 60 μ l стерилне воде (вода за инјекције, Галеника АД). Заостала РНК је уклоњена додатком 1 μ l (10 U· μ l⁻¹) рибонуклеазе А (*RNase A*, #EN0531, *Fermentas*) на 100 μ l узорка и инкубацијом на 37 °C у воденом купатилу током сат времена. Квалитет ДНК је проверен електрофорезом на 1 % агарозним геловима, а концентрација ДНК у сваком узорку је одређена спектрофотометријски после разблажења 1:100 у дејонизованој води. На основу односа апсорбанци (A) узорака 260 nm/280 nm потврђен је квалитет изоловане ДНК. Прихватљиве вредности за A260/280 су биле 1,6 - 2,1. Концентрација ДНК је одређена на основу апсорбанције на 260 nm, формулом:

$$\text{ДНК концентрација } [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] = A_{260} \cdot 50 \cdot 100 \text{ (фактор разблажења)}$$

пошто средњи екстинкциони коефицијент за дволанчану ДНК износи 0.020 ($\mu\text{g}/\text{ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (*Sambrook* и *Green*, 2012). Узорци ДНК су чувани на -20 °C до тренутка коришћења.

3.6 Третман дезоксирибонуклеазом

Контаминирајућа геномска ДНК је уклоњена из РНК изолата помоћу дезоксирибонуклеазе I (*DNase I*, #EN0521, *Fermentas*) према упутству произвођача. Компоненте реакционе смеше су приказане у табели 6.

Табела 6: Састав реакционе смеше за третман дезоксирибонуклеазом:

компонента	запремина [μl]
РНК (1 μg)	7.75
DEPC вода	
10x реакциони пуфер	1
DNAse I, 1 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (#EN0521, Fermentas)	1
RiboLock™, 40 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (#EO0381, Fermentas)	0.25
укупна запремина	10

Реакције су инкубиране у PCR-машини *peqSTAR 96 Universal Gradient* (Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Немачка). Након инкубације од 30 минута на 37 °C реакције су прекинуте додатком 1 μl 25 mM EDTA и додатном инкубацијом на 65 °C у трајању од 10 минута. Овим поступком добијено је 11 μl третиране РНК по узорку, што је директно коришћено у реакцији реверзне транскрипције.

3.7 Реверзна транскрипција

Синтеза комплементарне ДНК (*cDNA*) изведена је помоћу *Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* комплета (#K1622, Fermentas) према упутству произвођача. Компоненте реакционе смеше су приказане у табели 7.

Табела 7: Састав реакционе смеше за реверзну транскрипцију:

компонента	запремина [μl]
РНК третирана дезоксирибонуклеазом (1 μg)	11
олиго (dT) ₁₈ прајмер	1
5x реакциони пуфер	4
RiboLock™, 20 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1
10 mM dNTP	2
реверзна транскриптаза, 200 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (RevertAid™, M-MuLV)	1
укупна запремина	20

Реакције су инкубиране у PCR-машини *peqSTAR 96*, 60 минута на 42 °C што је праћено са 5 минута на 70 °C ради деактивације реверзне транскриптазе.

3.8 PCR амплификација

PCR реакције су постављане у стерилним условима. Коришћена је рекомбинантна *Taq* ДНК полимераза (#EP0401, *Fermentas*). Компоненте реакционе смеше су приказане у табели 8.

Табела 8: Састав реакционе смеше за PCR:

компонента	запремина [μ l]
ДНК или <i>cDNA</i> (200 ng)	16,3
вода	
специфични прајмери (7,5 μ M)	3,3
10x реакциони пуфер	2,5
25 mM $MgCl_2$	2
10 mM <i>dNTP</i>	0,5
<i>Taq</i> , 5 U· μ l ⁻¹ (<i>recombinant</i>)	0,4
укупна запремина	25

Секвенце прајмера коришћених за амплификацију *GS* и *GOGAT* транскрипата приликом *RT-PCR* и *qPCR* експеримената, као и за селекцију Т-ДНК хомозигота помоћу РНК маркера (поглавље 3.12) дате су у табели 9. Може се приметити да се у зависности од тога да ли се амплификује *cDNA* или ДНК очекују различите дужине ампликона (Табела 9). Ово је последица тога што су прајмери дизајнирани да хибридују са секвенцама на различитим егзонима. У случају *GLN1;4* и *GLN2* гена ДНК ампликон није очекиван јер су одговарајући прајмери дизајнирани да хибридују са секвенцом која се налази на споју два егзона.

Табела 9: Прајмери коришћени за RT-PCR и qPCR амплификацију GS и GOGAT гена:

ген	прајмер	секвенца (5'→3')	cDNA [bp]	ДНК [bp]
GLN1;1	GLN1;1-f	AGAAGTCATGCCGGGTCAGT	328	484
	GLN1;1-r	GTCAGCAGTCTCGTGGTGTC		
GLN1;2	GLN1;2-f	ACGGGACACCATGAAACTGC	304	386
	GLN1;2-r	GGCAGTGTC AACCGGTACAA		
GLN1;3	GLN1;3-f	TCGGCCCTGTTGAGGGTATT	354	517
	GLN1;3-r	CACGTCCCACCTCTCACTGAC		
GLN1;4	GLN1;4-f	GGAGTTCCAAGTCGGTCCCA	339	егзон-егзон
	GLN1;4-r	CGGTTTGCCACACCCCATAA		
GLN1;5	GLN1;5-f	CATGCCTGGACAATGGGAGT	367	716
	GLN1;5-r	CACCGATGCTCCACGATCC		
GLN2	GLN2-f	ATGCCTGGACAGTGGGAGTT	314	егзон-егзон
	GLN2-r	GTCTCGTGCTTTCCGGTCAA		
GLT1	GLT1-f	TCGAGCTGCGTTGAACCTTC	303	1008
	GLT1-r	CACTTGAGCAGACCCTCACG		
GLU1	GLU1-f	CTTGTTGGTCGTGTTGCTGGT	290	484
	GLU1-r	CTCCAGCTTTGCCTCTAGCG		
GLU2	GLU2-f	CCCTGTTGGGAAGGTTGAGC	303	539
	GLU2-r	TGACACCAAACGCCCTGAG		

Реакције су инкубирани у PCR-машини *peqSTAR 96*, према програму који се састојао од иницијалне денатурације (95 °C/5 минута), 40 циклуса денатурације (95 °C/15 s), хибридизације (58,5 °C/30 s) и екстензије (72 °C/30 s), што је праћено са 10 минута финалне екстензије на 72°C.

За селекцију Т-ДНК хомозигота ДНК маркерима коришћени су прајмери дати у табели 10. Инкубација се састојала од иницијалне денатурације (95°C/5 минута), 40 циклуса денатурације (95°C/60 s), хибридизације (55°C/60 s) и екстензије (72°C/60 s), што је праћено са 10 минута финалне екстензије на 72°C.

Табела 10: Прајмери коришћени за селекцију Т-ДНК хомозигота на нивоу ДНК:

ген/вектор	прајмер	секвенца (5'→3')	ДНК [bp]
GLN1;1	1;1ДНК <i>f</i>	GCAAAGCCAGGGTAATTTTTC	1081
	1;1ДНК <i>r</i>	TGTAGTTGCAGTGAGCACCAG	
GLN1;2	1;2ДНК <i>f</i>	TCAGTGGGATCAATGGAGAAG	1164
	1;2ДНК <i>r</i>	TGAGTACGCAACGATCTTGTG	
GLN1;3	1;3ДНК <i>f</i>	TGTAATTGTCAGCTTCGACCC	1013
	1;3ДНК <i>r</i>	TGAGTGGGAAAGAGAGTCACG	
GLN1;4	1;4ДНК <i>f</i>	ACGTTGAAAGATTTTGGGTT	1041
	1;4ДНК <i>r</i>	CCTACCGGCCACTTAATATCC	
GLN1;5	1;5ДНК <i>f</i>	TTTCGGAACAAAAATGACGTC	1116
	1;5ДНК <i>r</i>	GTACCTGAGGACCAGGAAAGC	
<i>pROK2</i>	<i>Salk LB</i>	TGGACCGCTTGCTGCAACT	500-700
<i>pCSA110</i>	<i>Sail LB</i>	ATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	500-700

За испитивање експресије *GS* гена код изолованих *knockout* мутаната коришћени су прајмери дати у табели 11. Програм инкубације се састојао од иницијалне денатурације (95 °C/5 минута), 40 циклуса денатурације (95 °C/15 s), хибридизације (59 °C/30 s) и екстензије (72 °C/30 s), што је праћено са 10 минута финалне екстензије на 72°C.

Табела 11: Прајмери за *RT-PCR* и *qPCR* аплификацију *GSI* гена код *knockout* мутаната:

ген	прајмер	секвенца (5'→3')	<i>cDNA</i> [bp]	ДНК [bp]
GLN1;1	1;1PHK <i>f</i>	GTCATGTGCGATGCGTACAC	286	368
	1;1PHK <i>r</i>	TGATCCCAGCGTATAAGCAGG		
GLN1;2	1;2PHK <i>f</i>	ACGGGACACCATGAAACTGC	304	386
	1;2PHK <i>r</i>	GGCAGTGTCAACCGGTACAA		
GLN1;3	1;3PHK <i>f</i>	TGTAATTGTCAGCTTCGACCC	376	460
	1;3PHK <i>r</i>	ACCGAGTATGGTCGTCTCAG		
GLN1;4	1;4PHK <i>f</i>	TCTTCAAAGACCCCTTCAGAAG	202	612
	1;4PHK <i>r</i>	CCTACCGGCCACTTAATATCC		
GLN1;5	1;5PHK <i>f</i>	TTTCGGAACAAAAATGACGTC	495	1227
	1;5PHK <i>r</i>	ACTGCACAATAGTACGGTCC		

За дизајн прајмера коришћене су интернет апликације *primer BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com>). Оптималне температуре хибридизације прајмера установљене су *PCR*-ом са

градијентом температуре. Специфичност прајмера је потврђена агарозном електрофорезом продуката након *RT-PCR*-а и анализом кривих топлјења након *qPCR* експеримента.

3.9 Агарозна електрофореза нуклеинских киселина

Провера квалитета изоловане РНК и ДНК као и раздвајање продуката *PCR* реакција вршено је хоризонталном електрофорезом (кадице: *BlueMarine*[™] 200 или *BlueMarine*[™] 100, *SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg*, Немачка; извор напајања: *Standard Power Pack P25, Biometra*[®], *Goettingen*, Немачка) на 1 - 1,5 % агарозним геловима у ТБЕ пуферу (89 mM *Tris*, 89 mM борна киселина, 2 mM *EDTA*) коме је додат етидијум бромид у финалној концентрацији од 1 μM. Електрофорезе су извођене при константном напону од 100 V током 1 - 1,5 сата. На гел је наносено по 10 μl *PCR* реакције помешано са 2 μl боје (*6X DNA Loading Dye, #R0611, Fermentas*) по узорку. Након електрофорезе ДНК је визуелизована на УВ трансилуминатору (*ST4 3026-WL/26M, Vilber Lourmat, Torcy*, Француска). За утврђивање величине фрагмената коришћени су ДНК маркери *O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (#SM1153, Fermentas)* или *GeneRuler 50 bp DNA Ladder (#SM0371, Fermentas)*.

3.10 Припремање стандарда за апсолутну квантификацију пречишћавањем *PCR* продуката са гела

Стандарди за *qPCR* припремљени су пречишћавањем раздвојених *PCR* продуката након гел електрофорезе. Екстракција са гела и пречишћавање *PCR* продуката изведени су коришћењем *GeneJET Gel Extraction Kit (#K0691, Fermentas)* комплета према упутству произвођача. Визуелизоване траке на гелу су под УВ светлом исечене стерилним скалпелом и пребачене у стерилне микротубе од 1.5 ml и додата им је једнака запремина везивног пуфера (*binding buffer*). Након тога уследила је инкубација на 60 °C у воденом купатилу до растварања гела (око 10 минута). Узорцима је затим додата једнака количина изопропанола, вортексовани су 5 s, нанесени на колоне за пречишћавање (*purification column*) и центрифугирани 1 минут на 10000 g. Филтрат је одбачен, а на колоне је додато по 700 μl раствора за испирање (*wash buffer*) и центрифугиране су 1 минут на 10000

g. Филтрат је одбачен и колоне су осушене додатним центрифугирањем у трајању од 1 минут на 10000 g. PCR фрагменти су елуирани са колоне додатком 50 μl елуционог пуфера (*elution buffer*) и центрифугирањем на 10000 g у току 1 минута. Пречишћеним PCR продуктима спектрофотометријски је одређена концентрација ДНК (поглавље 3.5)

3.11 Квантитативни PCR

Реакције квантитативног PCR-а (*qPCR*) постављане су коришћењем *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)* комплекта (#K0222, *Fermentas*) према упутству произвођача. Реакционе смеше запремине 25 μl садржале су количину *cDNA* која одговара 50 или 100 ng РНК и 0,3 μM прајмере. Амплификација је изведена са *ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, САД)*. Коришћени су исти програми инкубације као и приликом PCR амплификације за одговарајуће парове прајмера (табеле 9 и 11). Инкубације су праћене анализом топљења продукта амплификације како би се утврдила специфичност прајмера. Стандарди за апсолутну квантификацију припремљени су серијским разблаживањем пречишћених PCR продуката (поглавље 3.10) у распону од 10 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ - 1 $\text{fg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Резултати су анализирани програмом *7000 System SDS Software v1.2*.

3.12 Методе за селекцију Т-ДНК инсерционих хомозигота РНК маркерима

3.12.1 Експериментални дизајн

Семена Т1 генерације свих Т-ДНК инсерционих линија (Табела 4) посејана су у саксије са земљом и гајена као што је описано у поглављу 3.2.1. Након четири недеље, када су биљке развиле довољну биомасу розете, а пре издуживања стабла, испробане су методе за брзу селекцију „*SucPrep*” и „*Touch and go*” (*Berendzen* и сар., 2005), које се заснивају на брзој изолацији нуклеинских киселина, што омогућава испитивање великог броја узорака за кратко време. Тестиране методе заснивале су се на претпоставци да код Т-ДНК инсерционих хомозигота у неком *GS* гену неће бити детектована одговарајућа информациона РНК. За амплификацију *GSI cDNA* током селекције РНК маркерима коришћени су прајмери дати у табели 9 и одговарајући програм инкубације (поглавље 3.8)

3.12.2 „SucPrep” метода

Мањи лист из розете (око 10 mg ткива) је откинут и стављен у микротубу од 1,5 ml у коју је претходно наливено 200 μ l „SucPrep” пуфера (300 mM NaCl и 300 mM сахароза у 50 mM Tris-HCl, pH 7,5). Биљни материјал у пуферу хомогенизован је 10 s на леду пластичним тучком. Од добијене суспензије 3 μ l испипетирано је у смешу за реверзну транскрипцију са компонентама приказаним у табели 12. Остатак суспензије је загрејан 10 минута на 95-100 °C са циљем уклањања компоненти које интерферирају са RT-PCR-ом, након чега је центрифугиран 10 s на 5000 g и охлађен на леду. Од добијеног супернатанта испипетирано је 3 μ l у смешу за реверзну транскрипцију са компонентама приказаним у табели 12. Реакције су инкубиране према програму који је описан у поглављу 3.7.

Табела 12: Састав реакционе смеше за реверзну транскрипцију након „SucPrep”:

компонента	запремина [μ l]
„SucPrep” суспензија	3
вода	2,5
олиго (dT) ₁₈ прајмер	0,5
5x реакциони пуфер	2
RiboLock™, 20 U· μ l ⁻¹	0,5
10 mM dNTP	1
реверзна транскриптаза, 200 U· μ l ⁻¹	0,5
укупна запремина	10

Након реверзне транскрипције, 5 μ l добијеног раствора је додато у смешу за PCR реакцију (поглавље 3.8) која је садржала компоненте дате у табели 8.

3.12.3 „Touch and go” метода

Испробана је „Touch & go” метода са и без третмана дезоксирибонуклеазом:

1. Лист из розете је пробушен стерилним "RNase free" наставком од 100 μ l, и парче ткива ухваћено наставком је пипетирано у 7,75 μ l DEPC воде (#R0603, Fermentas), након чега је уследио третман дезоксирибонуклеазом

(поглавље 3.6) и реверзна транскрипција (поглавље 3.7). Након реверзне транскрипције, 5 μl смеше која је садржала *cDNA* помешано је са стандардним компонентама за *PCR* као што је приказано у табели 13, за чим је уследила инкубација (поглавље 3.8).

Табела 13: Састав реакционе смеше за „*Touch and go*” *PCR*:

компонента	запремина [μl]
<i>cDNA</i> (након реверзне транскрипције)	5
вода	11,3
специфични прајмери (7,5 μM)	3,3
10x реакциони пуфер	2,5
25 <i>mM</i> MgCl_2	2
10 <i>mM</i> <i>dNTP</i>	0,5
<i>Taq</i> , 5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (#EP0401, <i>Fermentas</i>)	0,4
укупна запремина	25

- Лист из розете је пробушен стерилним "*RNase free*" наставком од 100 μl , и парче ткива ухваћено наставком је пипетирано у 5 μl припремљене реакције за реверзну транскрипцију која је садржала 50 *U* реверзне транскриптазе (*RevertAid*TM *M-MuLV*, #K1622, *Fermentas*), 5 *U* инхибитора рибонуклеаза (*RiboLock*TM, 20 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), 5 μM олиго (*dT*)₁₈ прајмер, 1 *mM* нуклеотиде у реакционом пуферу. Након инкубације (поглавље 3.7) у реакције је додато по 7,5 μl припремљеног раствора са стандардним компонентама за *PCR* као што је приказано у табели 14, за чим је уследила инкубација (поглавље 3.8).

Табела 14: Састав реакционе смеше за „Touch and go” PCR без третмана дезоксирибонуклеазом:

компонента	запремина [μl]
<i>cDNA</i> (након реверзне транскрипције)	5
вода	3,15
специфични прајмери (7,5 μM)	1,65
10x реакциони пуфер	1,25
25 mM MgCl_2	1
10 mM <i>dNTP</i>	0,25
<i>Taq</i> , 5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (#EP0401, Fermentas)	0,2
укупна запремина	12,5

Пошто је „Touch and go” RT-PCR без третмана дезоксирибонуклеазом дао најбољи сигнал за тестиране ампликоне код дивљег типа биљке, овај поступак је даље коришћен за селекцију мутаната.

3.13 Екстракција и квантификација укупних слободних аминокиселина

Екстракција и квантификација укупних слободних аминокиселина је урађена по протоколу описаном у *Simonović* и *Anderson* (2007). Око 1 g биљног ткива је хомогенизовано у течном азоту помоћу авана и тучка. Након хомогенизације, у биљни материјал је додато 2 ml метанола и хомогенат је пребачен у пластичне епрувете које су вортексоване 10 s и центрифугиране 2 минута на 15000 g. Супернатант је одвојен, а преципитат је на исти начин ре-екстрахован са 2 ml метанола. Након центрифугирања, супернатанти су помешани и додато им је 2 ml хлороформа и 3 ml воде како би се уклонила неполарна једињења. Након центрифугирања у току од 5 минута на 5000 g горња поларна фаза је одвојена, ре-екстрахована са 2 ml хлороформа и упарена. Суви остатак је растворен у 500 μl дејонизоване воде. Концентрација укупних аминокиселина је одређена спектрофотометријски након реакције са нинхидрином. За реакцију са нинхидрином 20 μl узорка или стандарда помешано је са 50 μl 20 mM раствора нинхидрина у етанолу. Након инкубације у воденом купатилу на 100 °C у току 5 минута, раствори су разблажени са 930 μl етанола и измерена им је апсорбанца на

570 nm. Као стандарди припремљени су 1 - 15 mM раствори глицина у дејонизованој води.

3.14 Екстракција солубилних протеина

Биљно ткиво је спрашено у течном азоту помоћу авана и тучка. На сваких 200 - 400 mg ткива додат је 1 ml екстракционог пуфера (50 mM *Tris-HCl*, 1 mM *EDTA*, 20 % глицерол, 1,5 % поливинилполипирилодон, 10 mM дитиотреитол, 1 mM фенилметилсулфонил флуорид) и хомогенизација је настављена неколико минута. Хомогенати су потом центрифугирани 10 минута на 15000 g и 4 °C. Супернатанти су одвојени, замрзнути у течном азоту и чувани на -80 °C до коришћења. Пре употребе екстракти су одмрзнути на леду, поново центрифугирани 10 минута на 15000 g и 4 °C, и у супернатантима је одређена концентрација протеина методом коју је описао *Bradford* (1976). Помешано је 20 μ l протеинског екстракта са 980 μ l реагенса (#B6916, *Sigma-Aldrich*, *Saint Louis*, *Missouri*, САД) и након 5 минута очитана је апсорбанца на 595 nm на спектрофотометру *Agilent 8453*. Концентрација протеина одређена је са стандардне праве конструисане на основу апсорбанци раствора познатих концентрација албумина из говеђег серума.

3.15 Екстракција протеина из фракције обогаћене хлоропластима

Да би се добила фракција обогаћена хлоропластима, око 6 g свежих листова хомогенизовано је 30 s кухињским блендером са 30 ml изотоничног пуфера (330 mM сорбитол, 1 mM *EDTA*, 1 mM *MgCl₂*, 5 mM дитиотреитол, 1 % солубилни поливинилпирилодон у 50 mM *Hepes*-у, pH 7,5). Пуфер је претходно охлађен до појаве кристала леда. Добијени хомогенат филтриран је кроз један слој памучне вате и пет слојева газе и центрифугиран 5 минута на 3000 g. Део добијеног преципитата је ресуспендован у малој количини изотоничног пуфера и прегледан под светлосним микроскопом. Уочени су интактни хлоропласти, и у мањем броју фрагменти ћелијског зида и других органела. Остатак преципитата је ресуспендаван у 150 μ l екстракционог пуфера (50 mM *Tris-HCl*, 1 mM *EDTA*, 20 % глицерол, 1,5 % поливинилполипирилодон, 10 mM дитиотреитол, 1 mM фенилметилсулфонил флуорид) пребачен у микротубу од 1,5 ml и хомогенизован

пластичним тучком 30 s на леду. Хомогенати су потом центрифугирани 10 минута на 15000 g и 4 °C. Супернатант је одвојен и у њему је одређена концентрација протеина методом коју је описао *Bradford* (1976).

3.16 Нативна електрофореза са детекцијом GS изоформи

Изоформе глутамин синтетазе су раздвајане вертикалном дисконтинуалном електрофорезом у неденатуришућим условима на полиакриламидним геловима. Коришћен је *SE600 Ruby* (*Hoefer Inc., Holliston, MA, САД*) систем за електрофорезу уз напајање *PowerPac™ HC* (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, САД*). Раздвајајући гел се састојао од 7 % T и 2,67 % C, а концентрујући гел од 4 % T и 2,67 % C. Рецептūra за припремање гелова дата је у табели 15. Као пуфер за електрофорезу коришћен је 25 mM *Tris-HCl* и 192 mM глицин, pH 8,3. Пуфер за узорке није коришћен. На гел је наливено 100 µg укупних протеина по узорку.

Табела 15: Рецептūra за припремање 10 ml акриламидног гела одговарајућег умрежења:

компонента	10 % T	7 % T	4 % T
29,2 % акриламид, 0,8 % бисакриламид	3,35 ml	2,35 ml	1,35 ml
вода	3,8 ml	4,8 ml	6,6 ml
<i>Tris-HCl</i> , 1,5 M, pH 8,8	2,8 ml	2,8 ml	-
<i>Tris-HCl</i> , 1 M, pH 8	-	-	2 ml
тетраметилетилендиамин	10 µl	10 µl	25 µl
амонијум-персулфат 10 %	50 µl	50 µl	50 µl

Електрофорезе су извођене у трајању од 22 - 25 h, уз хлађење на 4 °C, при константном напону (100 V првих сат времена, и затим 180 - 200 V до завршетка електрофорезе). Детекција GS активности је изведена према методи *Simonović* и сар., (2004). По завршетку електрофорезе гелови су инкубирани 30 минута на 35 °C у пуферу са супстратима (20 mM натријум-глутамат, 20 mM ATP, 20 mM NH₄Cl, 20 mM MgCl₂, 50 mM KCl и 2 mM EDTA у 100 mM *Tris-HCl*, pH 8), затим су испрани дестилованом водом два пута по 20 s, а ослобођени фосфат је визуелизован преципитацијом амонијум-молибдатом (1 % (w/v) амонијум-хептамолибдат, и 100 mM триетиламин у 1 M HNO₃). Пошто се на овај начин

визуелизују све *ATP*-азне активности, у иницијалним експериментима додавани су специфични *GS* инхибитори *PPT* (*DL-phosphinothricin*, #45520 *Fluka*, *Sigma-Aldrich*) или *MSO* (*DL-methionine DL-sulfoximine*, #M9503, *Sigma-Aldrich*) у пуфер са супстратима како би се проверило које активности потичу од *GS*. У неким експериментима концентрације инхибитора у пуферу са супстратима су вариране од 0,1 до 1 *mM*.

У одређеним експериментима са *GS* из *L. corniculatus* пре нативне електрофорезе у узорке су додаване варирајуће концентрације *PPT*-а. Екстракт укупних протеина листа је разблажен изолационим пуфером без поливинилполипиролидона (50 *mM Tris-HCl*, 1 *mM EDTA*, 20 % глицерол, 10 *mM* дитиотреитол, 1 *mM* фенилметилсулфонил флуорид) до концентрације протеина од 2 *mg·ml⁻¹*. У 50 μ l овако разблаженог екстракта додат је *PPT* у финалним концентрацијама 1 - 1000 μ M, такође су у финалним концентрацијама додати 20 *mM ATP*, 20 *mM MgCl₂*, 50 *mM KCl* и 2 *mM EDTA* као што је приказано у табели 16. Паралелно су припремљени узорци без додатка *ATP*-а и узорци у којима је *PPT* замењен са *MSO*. Овако припремљени узорци су наливени на нативни гел, раздвојени и *GS* изоформе су детектоване.

Табела 16: Припрема *L. corniculatus* узорака за нативну електрофорезу:

<i>C_{PPT}</i> [μ M]	0	1	5	10	30	50	100	500	1000
екстракт [μ l]	50	50	50	50	50	50	50	50	50
200 <i>mM ATP</i> [μ l]	10	10	10	10	10	10	10	10	10
4x <i>GS</i> пуфер ¹ [μ l]	25	25	25	25	25	25	25	25	25
10 μ M <i>PPT</i> [μ l]	-	10	-	-	-	-	-	-	-
100 μ M <i>PPT</i> [μ l]	-	-	5	10	-	-	-	-	-
1 <i>mM PPT</i> [μ l]	-	-	-	-	3	5	10	-	-
10 <i>mM PPT</i> [μ l]	-	-	-	-	-	-	-	5	10
вода [μ l]	15	5	10	5	12	10	5	10	5

Напомена:

¹80 *mM MgCl₂*, 200 *mM KCl* и 8 *mM EDTA* у 100 *mM Tris-HCl*, pH 8

У одређеним експериментима након мешања протеинског екстракта са *PPT*-ом и осталим компонентама приказаним у табели 16, узорци су расољени уз измену пуфера гел-филтрацијом на *Sephadex[®] G-25*. Прах *Sephadex[®] G-25* (#G2580, *Sigma-Aldrich*) је након бубрења у води, еквилибрисан са три измене

одговарајућег пуфера у чаши и напакван у стаклене колонице дужине 100 mm и унутрашњег пречника 6 mm. Након паковања гел је заузимао 60-70 mm висине колонице. Напакван гел је еквилибрисан са најмање десет запремина одговарајућег пуфера пре наношења узорака. Коришћена су три пуфера на три различите колоне:

1. пуфер са *GS* супстратима: 20 mM натријум-глутамат, 20 mM *ATP*, 20 mM NH_4Cl , 20 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl и 2 mM *EDTA* у 100 mM *Tris-HCl*, pH 8
2. 50 mM *Tris-HCl* pH 8, 1 mM *EDTA*
3. 1 M KCl и 0,4 M $(NH_4)_2SO_4$ у 50 mM натријум-ацетату, pH 4.5

На сваку колону је нането по 100 μl узорка, и колоне су елуиране истим пуфером који је коришћен за еквилибрацију. Прикупљане су фракције од 50 μl и тестиране на присуство протеина мешањем 8 μl елуата са 2 μl *Bradford*-овог реагенса. Прве две фракције које су садржале протеине наливене су на гел за нативну електрофорезу.

3.17 Екстракција протеина из гела и денатуришућа електрофореза

У циљу одређивања молекулске масе субјединица које улазе у састав визуелизованих *GS* изоформи након нативне електрофорезе, протеини су екстраховани са препаративног нативног гела, раздвојени денатуришућом *SDS* електрофорезом, пренети на мембрану и детектовани антителима специфичним за *GS*.

Након препаративне електрофорезе и детекције, визуелизоване *GS* изоформе су исечене са нативног гела, испиране два пута по 30 минута са 50 mM *Tris-HCl* pH 8, до растварања фосфатног преципитата. Затим су траке гела уситњене истискивањем 10 пута кроз пластичне шприцеве од 5 ml (*Scheer* и *Ryan*, 2001). Уситњен гел је потом инкубиран, уз повремено вортексовање, 1 h на 50 °C (или преко ноћи на собној температури) у 200 μl пуфера за денатурацију (1 % *SDS* и 3 % β -меркаптоетанол у 50 mM *Tris-HCl*, pH 6,8 или pH 8). Након инкубације супернатант је покупљен, и помешан са пуфером за узорке (1 % *SDS*, 1 % β -

меркаптоетанол, 0,004 % бромфенол плаво, 50 % глицерол у 50 mM Tris-HCl, pH 6,8) у односу 5:1 (v/v) и нанесен на SDS гел.

Денатуришућа електрофореза је извођена према методи коју је описао Laemmli (1970). Коришћена је Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories) кадица за електрофорезу уз напајање PowerPac™ HC (Bio-Rad Laboratories). Састав раздвајајућег гела и пуфера за електрофорезу био је исти као приликом нативних електрофореза, уз додатак 0,1 % SDS. Концентрујући гел је припремљен са Tris-HCl, pH 6,8 пуфером у финалној концентрацији од 0,125 M, уз додатак 0,1 % SDS-а. Раздвајајући гел се састојао од 10 % T и 2,67 % C, а концентрујући гел од 4 % T и 2,67 % C. За утврђивање молекулске масе коришћени су протеински маркери (#SM0441, Fermentas или #26623, Thermo Scientific).

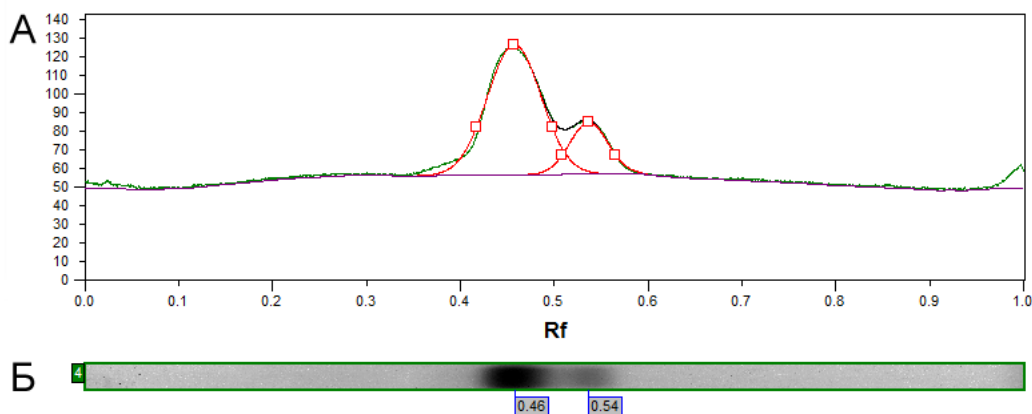
3.18 Пренос протеина са гела на мембрану и детекција антителима

Протеини су пренети на нитроцелулозну мембрану (0.45 μm , #N8267, Sigma-Aldrich) мокрим блотом помоћу Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories) система опремљеног адаптером за трансфер протеина према упутству произвођача. Као извор струје коришћен је PowerPac™ HC (Bio-Rad Laboratories). Протеини су преношени при константном напону од 50 V, у трајању од 1 до 1,5 h уз хлађење система. Као трансфер пуфер коришћен је 25 mM Tris-HCl, 192 mM глицин, pH 8,3. Мембране су након трансфера инкубиране преко ноћи на 4 °C, у раствору 10 % немасног млека (NFDM, Nestle, Vevey, Швајцарска) у T-PBS пуферу (10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 8 % NaCl, 0,2 % KCl, и 0,05 % Tween-20). Следећег дана мембране су инкубиране два сата на собној температури уз благо мешање са примарним антителом (поликлонска антитела из зеца) специфичним за GS (#AS08 295, Agrisera, Vännäs, Шведска) које је разблажено 1:10000 (v/v) у раствору 5 % немасног млека у T-PBS пуферу. Мембране су затим испиране у T-PBS пуферу, према шеми: 2 x 1 минут; 1 x 15 минута и 3 x 5 минута. Следила је једночасовна инкубација мембрана на собној температури, са секундарним антителом (#A0545, Sigma-Aldrich) које је кођуговано са пероксидазом из рена. Секундарно антитело је разблажено 1:20000 (v/v) у раствору 5 % немасног млека у T-PBS пуферу. Мембране су затим испиране у T-

PBS пуферу према шеми: 2 x 1 минут; 1 x 15 минута и 3 x 5 минута. Детекција је извршена методом појачане хемилуминисценције (Mruk и Cheng, 2011). Мембране су инкубиране 5 минута у раствору који је садржао 0,2 mM *p*-кумарну киселину, 1,25 mM 3-аминофталхидразид (луминол) и 0,01 % (v/v) водоник пероксид у 100 mM Tris-HCl пуферу, pH 8. Након тога, мембране су изложене филму Kodak X-Omat LS (#F0899, Sigma-Aldrich) у трајању од 5 минута, који је потом развијен према упутству произвођача.

3.19 Анализа скенираних гелова

Слике скенираних гелова су анализиране помоћу софтвера TotalLab120 v2009 (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle, Британија). Денситометријска анализа гелова урађена је са следећим параметрима: позадина је уклоњена *rolling ball* методом подешеном на 200 - 1500 у зависности од гела (увек иста вредност приликом анализе трака на једном гелу); траке су мануелно одабране; гаусовске криве које одговарају денситометријским пиковима су одрађене коришћењем напредног алгоритма. Интензитет трака у различитим узорцима је поређен упоређивањем гаусовских кривих које одговарају пиковима .



Слика 12: Пример денситограма. **А** - два пика (зелено) којима је позадина уклоњена *rolling ball* алгоритмом подешеним на 1500 (љубичасто), са уклопљеним гаусовским кривама (црвено) и одговарајућом сумом уклопљених гаусовских крива (црно). **Б** - Изглед анализираних миграционих путања.

3.20 Статистичка обрада података

Статистичке анализе су урађене коришћењем софтвера *Statistica 8* (*StatSoft Inc., Tulsa, OK, САД*). Током анализе података експресије *GS* и *GOGAT* гена, када су поређена два скупа података, за контролу и за одређени третман, значајност разлика је утврђена Студентовим т-тестом са нивоима значајности $p \leq 0,05$ (*) и $p \leq 0,01$ (**). У случајевима када је поређено више скупова података, они су подвргнути анализи варијансе (*ANOVA*), а поређења између средњих вредности су урађена помоћу *Fisher LSD* теста најмање значајних разлика, са нивоом значајности од $p \leq 0.05$. На овај начин је поређен прираст биомасе код звездана третираног различитим концентрацијама *PPT*-а, као и денситометријски одређен интензитет *GS* трака у гелу.

3.21 Остали коришћени програми

За одређивање хомологије између секвенци и за поређење секвенци коришћен је *Clustal Omega* (*Sievers и сар., 2011*). Поређење секвенци је приказано помоћу *Jalview 2.8* (*Waterhouse и сар., 2009*). Предвиђање *cTP* секвенци урађено је помоћу *ChloroP 1.1 server* (*Emanuelsson и сар., 1999*). За одређивање *pI* и *MW* протеина на основу секвенце коришћена је интернет апликација *expasy - compute pI/Mw tool* (www.expasy.org). За 3D приказ *GS* структура коришћен је слободан софтвер *Jmol* (<http://www.jmol.org/>). За цртање формула коришћена је интернет апликација *eMolecules* (<http://www.emolecules.com/>). За приказ мапа експресије *GS* и *GOGAT* гена у различитим фазама развића *A. thaliana* (Прилог 1) коришћен је *Arabidopsis eFP browser* (*Winter и сар., 2007*).

4. Резултати

4.1 Протокол за екстракцију *GS* протеина са нативних гелова након детекције ензимске активности

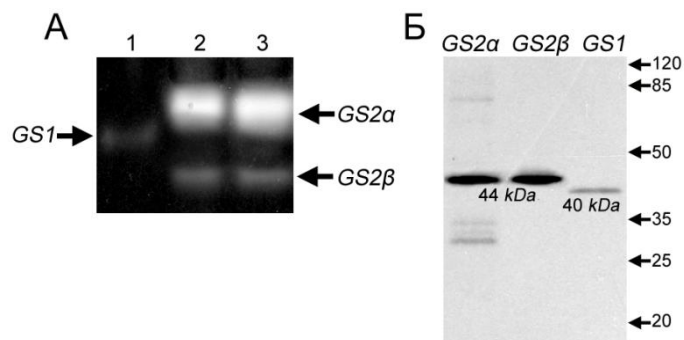
За одређивање услова екстракције *GS* протеина након детекције у нативном гелу коришћен је спанаћ због доступности биљног материјала и малог броја *GS* гена (по један ген за хлоропластну и цитосолну изоформу), односно изоформи, пошто у прелиминарним експериментима са *GS* из *A. thaliana* нису добијани репродуцибилни резултати.

Солубилни протеини су екстраховани из корена, листа, и хлоропласта спанаћа, раздвојени нативном електрофорезом и детектовани на основу активности у гелу (Слика 13А). У корену је детектована једна изоформа, док су у листу и хлоропластима детектоване две *GS* изоформе, што је било изненађујуће имајући у виду да спанаћ поседује по један ген за *GS1* (*GenBank: EU057984*) и *GS2* (*GenBank: EF143582*). Активности нису детектоване када је у пуфер са супстратима додат *GS* специфични инхибитор *MSO* у финалној концентрацији од 5 *mM* (резултат није приказан).

У циљу одређивања молекулске масе субјединица које улазе у састав детектованих *GS* изоформи, визуелизоване траке су екстраховане са гела како би протеини били раздвојени у другој димензији *SDS* електрофорезом. Установљено је да је есенцијалан корак за успешну екстракцију, денатурацију и каснију детекцију *GS* протеина антителима, еквilibрација гела до неутралног *pH* након преципитације ослобођеног фосфата. Преципитован фосфат се током еквilibрације полако раствара са гела, при чему траке активности полако нестају. Из тог разлога су визуелизоване траке прво исечене са гела након детекције, а затим еквilibрисане.

Како би се утврдила молекулска маса субјединица, екстраховане изоформе су раздвојене денатуришућом *SDS* електрофорезом, пребачене на мембрану и детектоване специфичним антителима. Обе хлоропластне изоформе су дале по једну траку од 44 *kDa*, цитосолна изоформа је дала једну траку масе 40 *kDa*

(Слика 13Б). У узорку *GS2α* детектована је трака од 80 *kDa* која вероватно одговара *GS2* димеру и три траке нижих молекулских маса које вероватно представљају протеолитичке фрагменте *GS2* протеина.



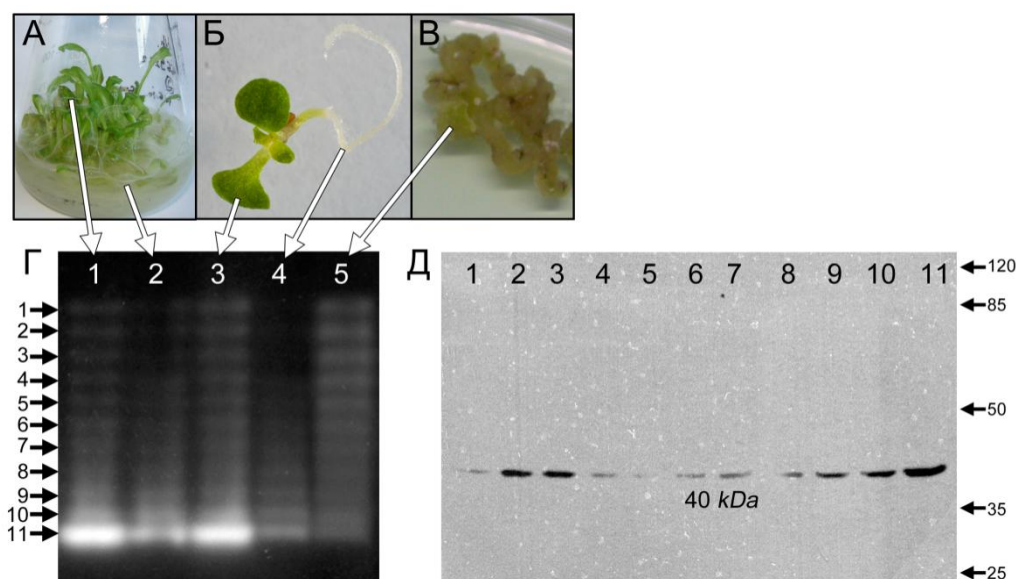
Слика 13: Изоформе *GS* код спанаћа. **А** - солубилни протеини су екстраховани из **1** - корена, **2** - листа и **3** - изолованих хлоропласта, раздвојени нативном електрофорезом и детектовани на основу активности у гелу; **Б** – траке са детектованим *GS* активностима у листу и хлоропласту (*GS2α* и *GS2β*), и цитосолном *GS* активношћу која је детектована у корену (*GS1*) су исечене са препаративног гела, протеини су денатурирани и екстраховани, раздвојени SDS електрофорезом, пренесени на мембрану и детектовани специфичним антителима. Са десне стране је означен положај протеинских маркера на нитроцелулозној мембрани.

4.2 Утицај различитих услова гајења и врсте ткива на електрофоретске профиле *GS* изоформи код *A. thaliana*

У циљу постизања што боље резолуције *GS* активности детектованих на нативним геловима, испитиван је утицај различитих услова гајења и типа ткива на електрофоретске профиле *GS* изоформи код *A. thaliana*. Солубилни протеини су екстраховани из листова и коренова четири недеље старих клијанаца гајених *in vitro* у течној *MS* подлози (Слика 14А), на чврстој *MS*_{1/2} подлози (Слика 14Б), као и из калуса (Слика 14В).

У корену и листу *in vitro* гајених биљка и у калусима детектовано је једанаест АТФ-азних активности (Слика 14Г). Активности нису детектоване када су у пуфер са супстратима додати *GS* специфични инхибитори *PPT* или *MSO* у

финалној концентрацији од 5 mM (результат није приказан), што је потврда да детектоване активности потичу од GS изоформи.



Слика 14: Изоформе GS код *A. thaliana*: **A** - култура клијанаца у течном медијуму **B** - култура клијанаца на чврстом медијуму; **C** - култура калуса; **D** - детекција GS активности након нативне електрофорезе (100 μ g протеина нанесено по бунарићу); протеини су екстраховани из: **1** - листова биљка гајених у течној подлози, **2** - коренова биљка гајених у течној подлози, **3** - листова биљка гајених на чврстој подлози, **4** - коренова биљка гајених на чврстој подлози **5** - калуса; **E** - вестерн блот: траке са 11 детектованих активности су исечене након препаративне електрофорезе протеинског екстракта листа, протеини су екстраховани из гела, раздвојени денатуришућом електрофорезом, пренесени на мембрану и детектовани GS специфичним антителима. Положај протеинских маркера на нитроцелулозној мембрани је такође приказан.

У екстрактима коренова биљака гајених на чврстој подлози три најспорије мигрирајуће изоформе су биле веома слабог интензитета, док су у екстрактима коренова биљка гајених у течној подлози биле нешто јачег интензитета, али ипак слабије у односу на активност осталих изоформи. Интензитет детектованих изоформи је био уједначен у узорку из калуса, док је у осталим узорцима изоформа са највишом мобилношћу (Трака 11, Слика 14D) била најинтензивнија, што је сугерисало да у калусу постоји другачији однос експресије изоформи у односу на корен и лист. У протеинским екстрактима изолованих хлоропласта

иницијално је детектована активност, која је по мобилности одговарала двома најспоријим изоформама у другим узорцима (траке 1 и 2, слика 14Г). Овај резултат није приказан, пошто га није било могуће репродуковати током каснијих експеримената, када у протеинским екстрактима хлоропласта није детектована *GS* активност, што указује на могућу нестабилност односно инхибицију ове изоформе, у самом ткиву или током процеса екстракције и електрофорезе.

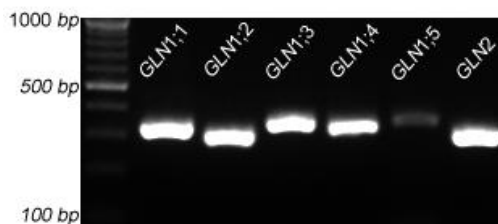
SDS електрофорезом у другој димензији је утврђено да се све детектоване *GS* изоформе састоје од субјединица чија молекулска маса износи 40 *kDa* (Слика 14Г), која одговара маси *GSI* протеина (*Ishiyama* и сар., 2004b).

Пошто *A. thaliana* поседује пет *GSI* гена који кодирају протеине релативно високе хомологије, и обзиром да се биљни *GS* ензими састоје најмање од осам, а вероватно од десет субјединица, може се поставити питање да ли продукти различитих *GSI* гена *A. thaliana* могу да формирају функционалне ензиме. Ова могућност изгледа вероватна пошто је у различитим ткивима детектовано више *GSI* изоформи него што је кодирано у геному. У циљу провере овога и идентификације субјединица које улазе у састав детектованих изоформи селектовани су Т-ДНК инсерциони хомозиготи у *GSI* генима (поглавље 4.5), а затим су поређени електрофоретски профили *GS* изоформи код изолованих *GSI knockout* мутаната (поглавље 4.7).

4.3 Експресија *GS* гена у различитим ткивима *A. thaliana*

Као први корак у одгонетању субјединичног састава 11 детектованих изоформи, проверен је ниво експресије *GS* гена у различитим ткивима, како би се установило да ли сви типови субјединица учествују у формирању добијеног зимограма (Слика 14Г). РНК је изолована из листова и коренова четири недеље старих биљка гајених *in vitro* у течној *MS* подлози и из калуса. Ова ткива су одабрана јер је у њима детектовано свих 11 *GS* изоформи при нативној електрофорези. Нарочито је занимљиво било испитати да ли постоје разлике у експресији *GS* гена у калусу у односу на лист и корен, због различитог односа у интензитету детектованих *GS* изоформи између ових ткива (поглавље 4.2).

Изолована РНК је реверзно-транскрибована и ниво експресије одабраних гена одређен *qPCR*-ом. Специфичност прајмера коришћених за *qPCR* квантификацију и оптимална температура хибридизације су претходно утврђени *PCR*-ом са градијентом температуре. Сви парови прајмера били су специфични на температури 58,5 °C (Слика 15) дајући *PCR* продукте очекиване дужине (Табела 17).



Слика 15: *RT-PCR* продукти *GS* гена добијени након амплификације са прајмерима датим у табели 9.

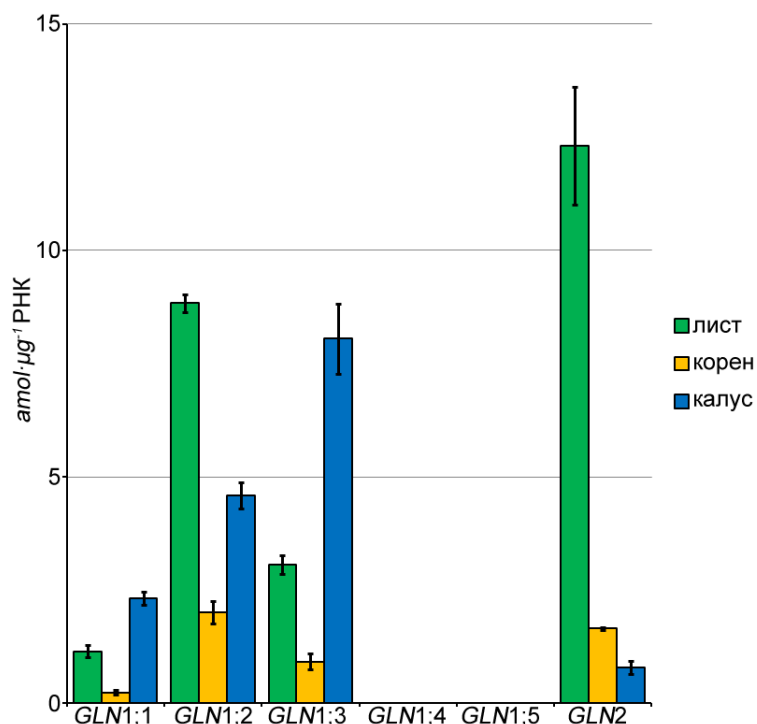
Табела 17: Провера дужине фрагмената након *RT-PCR* амплификације:

ген	ампљикон [bp]	
	теоретски	експериментално
<i>GLN1;1</i>	328	329
<i>GLN1;2</i>	304	305
<i>GLN1;3</i>	354	344
<i>GLN1.4</i>	339	339
<i>GLN1.5</i>	367	367
<i>GLN2</i>	314	305

Стандарди за апсолутну квантификацију су припремљени пречишћавањем *PCR* продукта са гела и разблаживањем до финалних концентрација у опсегу 10^3 - 10^7 копија по μl .

Сви *GS* гени који кодрају цитосолне ензиме имали су већу експресију у листу у односу на корен (Слика 16). Од *GS1* гена највише транскрипата детектовано је за *GLN1;2* ($8,8 \text{ amol}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ изоловане РНК листа и $2 \text{ amol}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ РНК корена), што је око 3 пута више од *GLN1;3* гена ($3 \text{ amol}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ РНК листа и $0,9 \text{ amol}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ РНК корена). Количина транскрипата *GLN1;1* износила је $1,2 \text{ amol}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ изоловане РНК листа што је око 5 пута више од количине транскрипата у корену.

Експресија *GLN1;4* и *GLN1;5* гена била је јако ниска, са тек двоцифреним бројем детектованих копија. У складу са унутарћелијском локализацијом и физиолошком улогом, експресија *GLN2* била је око 8 пута виша у листу у поређењу са кореном, и са $12,3 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ изоловане РНК листа, овај ген је имао највећи број детектованих транскрипата од свих *GS* гена.

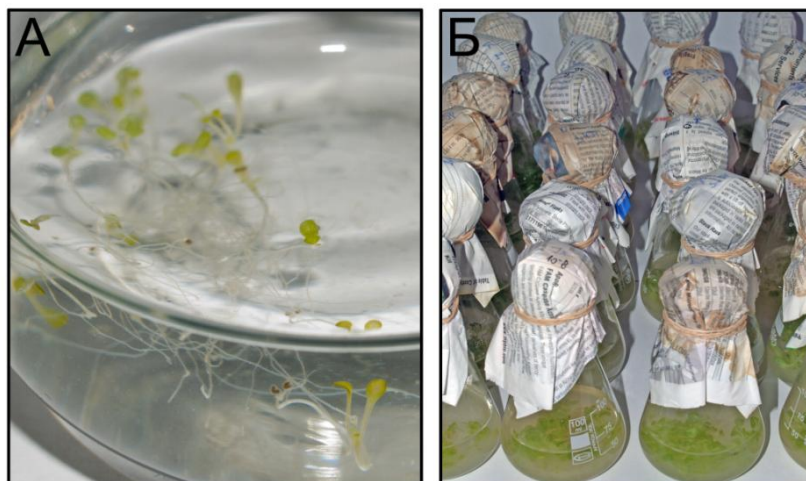


Слика 16: Количина *GS* транскрипата по μg изоловане РНК у листу, корену и калусу. На графицима је приказана средња вредност три биолошка понављања са стандардном грешком.

У калусу се образац експресије *GS* гена значајно разликовао у односу на лист и корен: највишу експресију имао је *GLN1;3* ($8 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК), за њим је следио *GLN1;2* ($4,6 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК) и *GLN1;1* ($2,3 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК). Експресија *GLN2* гена била је двоструко нижа у односу на корен и износила је $0,8 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК. Гени *GLN1;4* и *GLN1;5* су у овом узорку имали јако низак ниво експресије.

4.4 Регулација експресије гена *GS-GOGAT* циклуса биљним регулаторима растења

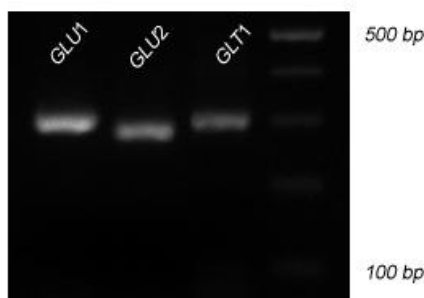
Разлике у експресији *GS* гена у калусима у односу на лист и корен (поглавље 4.3), указале су на могућност да је експресија ових гена регулисана биљним хормонима, с обзиром да су за индукцију и одржавање калуса коришћени регулатори растења *KIN* и *2,4-D*. У недостатку литературних података о утицају фитохормона на експресију *GS* гена, спроведено је шире испитивање утицаја репрезентативних регулатора растења на експресију гена *GS-GOGAT* циклуса. Одабрано је по једно репрезентативно једињење из четири класе биљних регулатора растења: *2,4-D*, *ABA*, *KIN* и *GA3*. Биљке су третиране различитим концентрацијама ових регулатора растења и анализирана је експресија гена који кодирају изоформе глутамин-синтазе (*GLN1;1*, *GLN1;2*, *GLN1;3*, *GLN1;4*, *GLN1;5* и *GLN2*) и глутамат-синтазе (*GLU1*, *GLU2* и *GLT1*).



Слика 17: Изглед биљака гајених у течној подлози: **А** - недељу дана након засејавања, **Б** - непосредно пре узорковања ткива.

Четири недеље стари клијанци гејени у течној *MS* хранљивој подлози, пребачени су у свеже хранљиве подлоге које су садржале различите концентрације (10^{-8} - 10^{-5} *M*) регулатора растења (Слика 17). Контролне биљке су пребачене у свежу *MS* подлогу без регулатора растења. Након 24 *h*, из листова и корена изолована је РНК, реверзно-транскрибована и ниво експресије одабраних гена одређен *qPCR*-ом уз апсолутну квантификацију.

Прајмери за *qPCR* квантификацију *GS* транскрипата и оптимална температура хибридизације су претходно утврђени (поглавље 4.3). Дизајнирани *GOGAT* прајмери (Табела 9) такође су били специфични при температури хибридизације од 58,5 °C (Слика 18) дајући *PCR* продукте очекиване дужине (Табела 18).

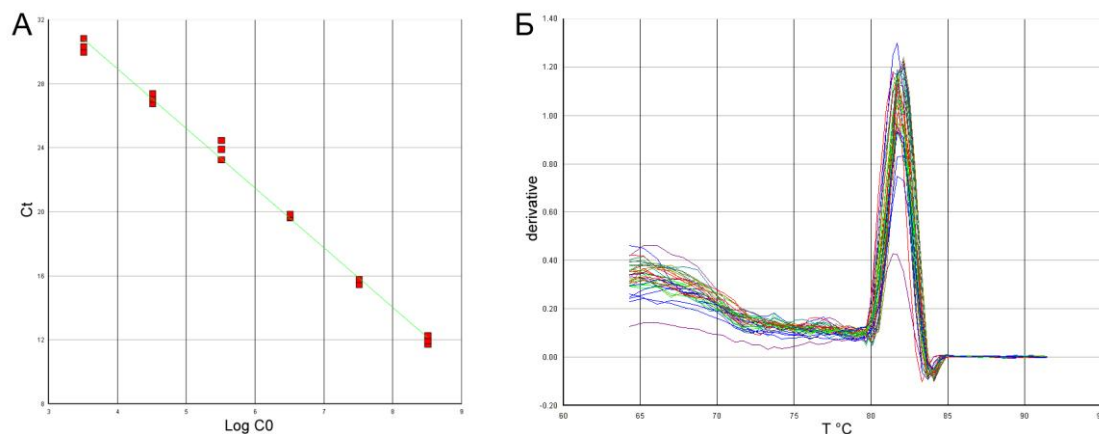


Слика 18: *RT-PCR* продукти *GOGAT* гена добијени након амплификације са прајмерима датим у табели 9.

Табела 18: Провера дужине фрагмената након *RT-PCR* амплификације.

ген	ампликон [bp]	
	теоретски	експериментално
<i>GLU1</i>	303	305
<i>GLU2</i>	290	286
<i>GLT1</i>	303	305

Стандарди за *qPCR* апсолутну квантификацију су припремљени пречишћавањем *PCR* продукта са гела и разблаживањем до финалних концентрација у опсегу 10^3 - 10^7 копија по μl . Анализа температуре топљења (*Tm*) ампликона након *qPCR* експеримента показала је да је у свим реакцијама настао по један производ.

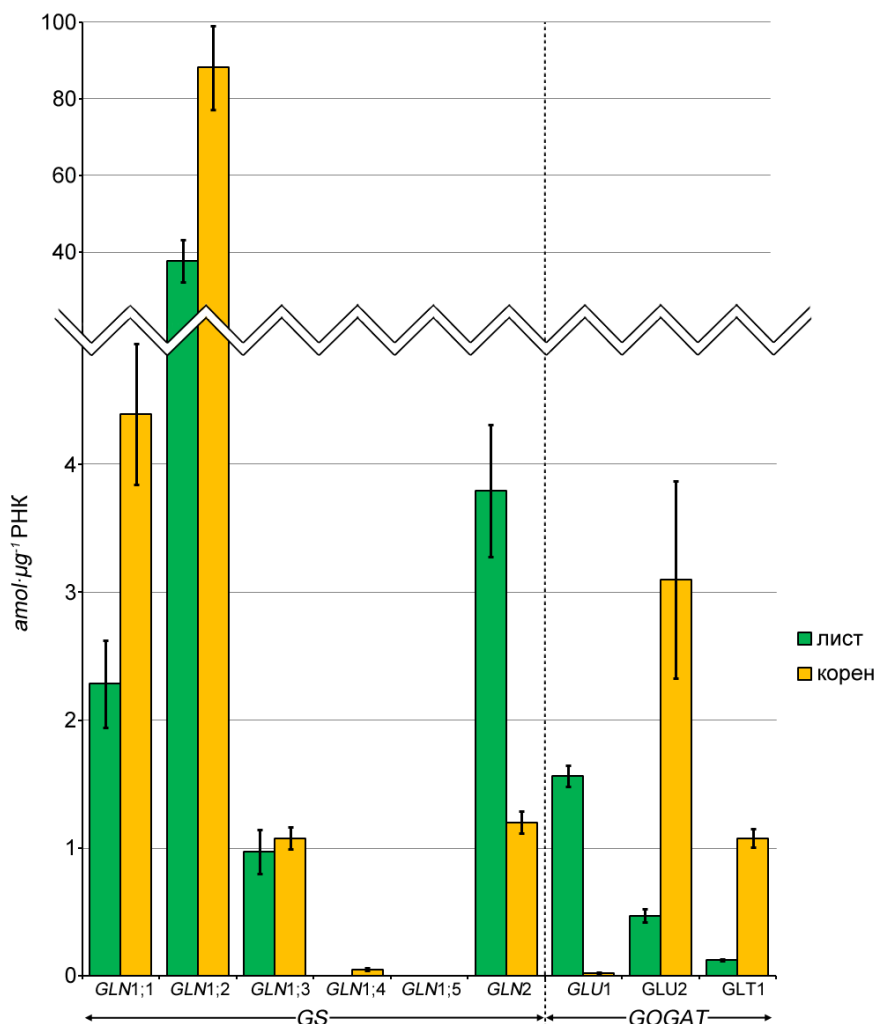


Слика 19: *А* - пример стандардне криве за апсолутну квантификацију транскрипата *qPCR*-ом. *Б* - анализа температуре топљења насталих продуката након *qPCR* амплификације *GLN1;1 cDNA*.

Код контролних биљака, које нису третиране регулаторима растења већ су након четири недеље пребачене у свежу *MS* подлогу у трајању од 24 *h*, експресија *GS* гена који кодрају цитосолне ензиме била је већа у корену у односу на лист. Овакав однос експресије између листа и корена је другачији од претходно описаног (Слика 16). Вероватан разлог је пребацивање биљака у свежу подлогу у току 24 *h* пре екстракције РНК, чиме је обновљен садржај нутријената, међу којима су и познати регулатори експресије *GS* гена, сахароза и амонијум-јон (Oliveira и Coruzzi, 1999; Ishiyama и сар., 2004b). *GLN1;2* имао је највиши ниво експресије ($88 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК за корен и $37 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК за лист), што је око 20 пута више од *GLN1;1* гена ($4,4 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК за корен и $2,3 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК за лист). Количина транскрипата *GLN1;3* била је слична у листу и корену (око $1 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК). Експресија *GLN1;4* гена је била доста нижа, у корену је износила $0,051 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ изоловане РНК, док је у листу била око 30 пута мања. Експресија *GLN1;5* гена је била јако ниска што је спречило прецизну квантификацију. Експресија *GLN2* била је већа у листу ($3,8 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК) у односу на корен ($1,2 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК).

Експресија *GOGAT* гена показала је значајне разлике у листу у односу на корен. У листовима је детектовано највише *GLU1* транскрипата ($1,56 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК), око 70 пута више него у корену. Највиши ниво експресије у корену имао је *GLU2* ген ($3 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК), што је око 6 пута више у односу на експресију овог

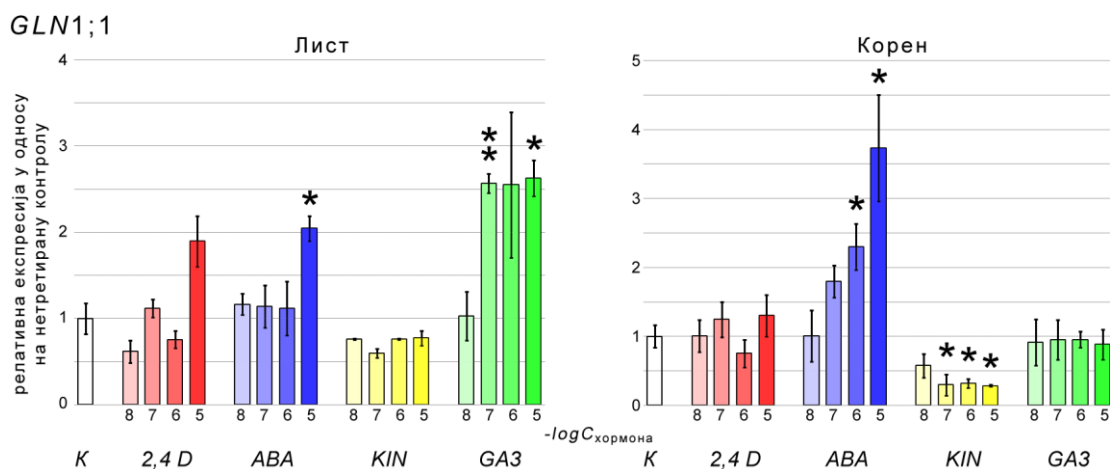
гена у листу ($0,48 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ РНК}$), за њим је по количини транскрипата следио *GLT1* са $1,1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ изоловане РНК, што је око 9 пута више у односу на лист (Слика 20).



Слика 20: Количина транскрипата *GS* (*GLN1;1*, *GLN1;2*, *GLN1;3*, *GLN1;4*, *GLN1;5* и *GLN2*) и *GOGAT* (*GLU1*, *GLU2* и *GLT1*) гена у листу и корену. Биљке су гајене *in vitro* четири недеље у течном *MS* медијуму на пребачене 24 h на свежу хранљиву подлогу након чега је РНК изолована из листова и корена. На слици је представљена средња вредност три биолошка понављања од по 10 биљака са стандардном грешком.

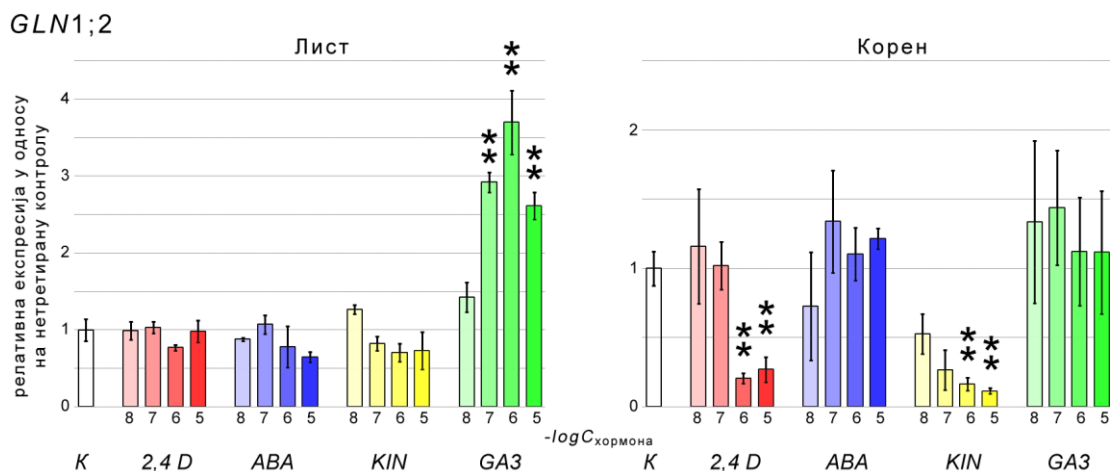
На сликама 21-28 представљена је релативна експресија гена у листу и корену биљака третираних регулаторима растења: *2,4-D*, *ABA*, *KIN* и *GA3*, у односу на нетретирану контролу - *K*. На графицима је приказана средња вредност три биолошка понављања од по 10 биљака са стандардном грешком. Значајност

разлика између третмана је одређена Студентовим т-тестом и приказана са * ($p < 0,05$) и ** ($p < 0,01$).



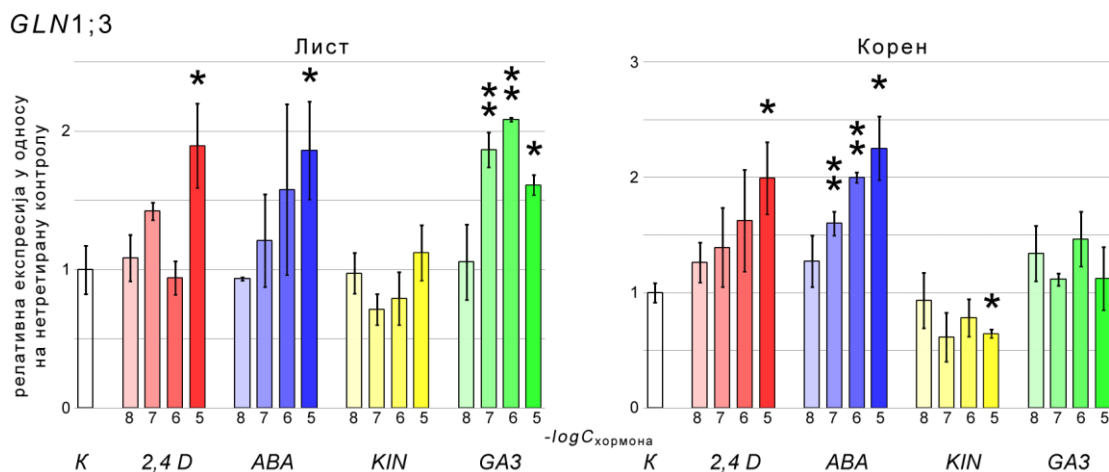
Слика 21: Релативна експресија *GLN1;1* гена при означеним третманима.

Тестиране концентрације 2,4-D-а нису, статистички значајно, промениле експресију *GLN1;1* гена. Третман 10^{-5} M ABA-ом довео је до двоструког повећања експресије *GLN1;1* гена у листу и скоро четири пута веће експресије у корену. За ред величине нижа концентрација ABA-е имала је утицај само на експресију у корену. Третман са KIN-ом у концентрацијама од 10^{-7} до 10^{-5} M је довео до редукције експресије у корену на ниво од 25 - 30 % од контроле, док је експресија у листу остала непромењена. Насупрот томе, третман са GA3, имао је утицаја само на експресију у листу, где је дошло до повећања од 2,5 пута при концентрацијама од 10^{-7} до 10^{-5} M.



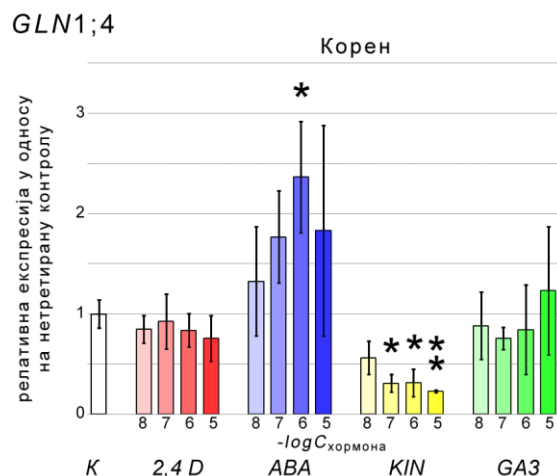
Слика 22: Релативна експресија *GLN1;2* гена при означеним третманима.

На експресију *GLN1;2* гена у корену утицај су имали *2,4-D* и *KIN*. Третмани са 10^{-6} и 10^{-5} *M KIN*-ом довели су до снижења количине детектованих транскрипата око 8 пута. Третман са *2,4-D*-ом довео је до снижења броја транскрипата од око 5 пута при две највише концентрације (10^{-6} и 10^{-5} *M*). *GA3* је имала утицај на експресију *GLN1;2* гена само у листу. Концентрације опсега од 10^{-7} до 10^{-5} *M* довеле су до троструког повећања количине *GLN1;2* транскрипата.



Слика 23: Релативна експресија *GLN1;3* гена при означеним третманима.

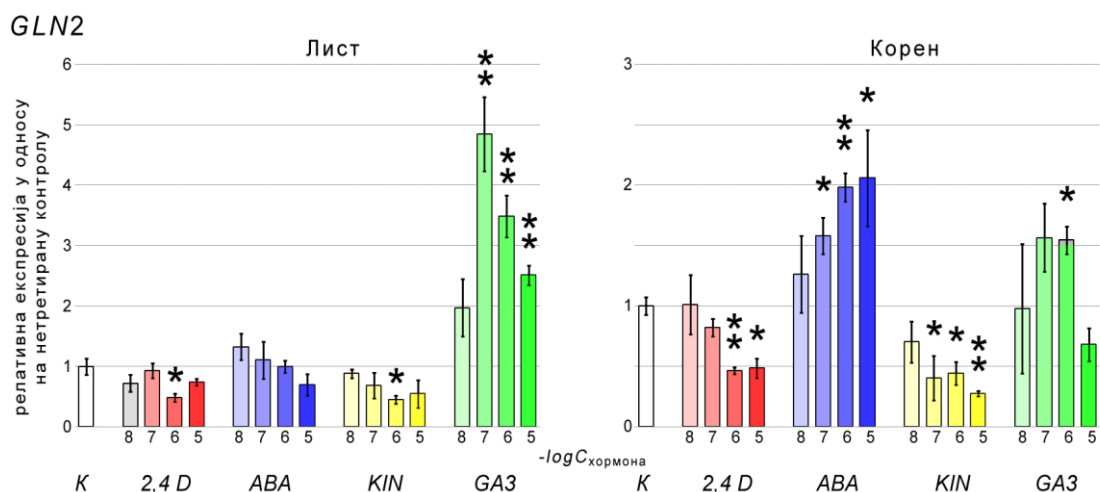
На експресију *GLN1;3* у листу и корену имали су утицај третмани са *ABA*-ом и са *2,4-D*-ом, који су проузроковали двоструко повећање експресије у оба ткива, при чему је корен био осетљив и на ниже концентрације *ABA*-е (10^{-7} и 10^{-6} *M*). Третман кинетином је довео до малог (65 % од контроле) смањења експресије у корену при највишој тестираној концентрацији (10^{-5} *M*). Третман са *GA3*, имао је утицаја само на експресију у листу, где је детектовано двоструко више транскрипата код биљака третираних широким опсегом концентрација овог хормона (10^{-7} до 10^{-5} *M*).



Слика 24: Релативна експресија *GLN1;4* гена при означеним третманима.

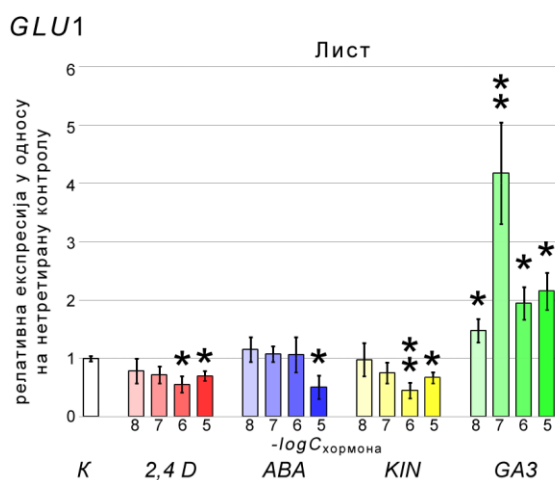
Услед изузетно ниске количине транскрипата *GLN1;4* у листу, прецизност квантификације је била ниска, што се огледало у јако великој варијабилности међу понављањима. Због тога је изостављена анализа експресије *GLN1;4* у листу. У корену, третман са *KIN*-ом редуковао је експресију *GLN1;4* гена (22 - 30 % од контроле) у широком опсегу тестираних концентрација (10^{-7} до 10^{-5} M), док је третман са 10^{-6} M *ABA*-ом имао стимулаторан ефекат повећавајући количину *GLN1;4* транскрипата за око 2,5 пута.

Експресија *GLN1;5* гена није анализирана због изразито ниске количине транскрипата у ткиву.



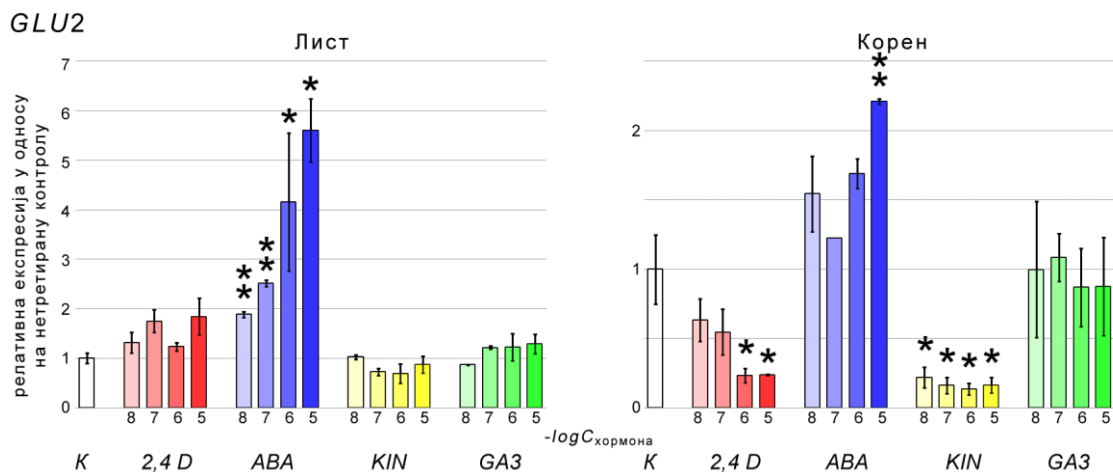
Слика 25: Релативна експресија *GLN2* гена при означеним третманима.

Третмани са 10^{-6} M KIN-ом и 2,4-D-ом довели су до двоструког снижења броја *GLN2* транскрипата у листу. Експресија *GLN2* у корену била је осетљива на шири опсег концентрација ових хормона (10^{-6} и 10^{-5} M за 2,4-D и 10^{-7} - 10^{-5} M за KIN), при чему је KIN довео до значајније редукције броја транскрипата (28 % од контроле) у поређењу са 2,4-D (46 % од контроле). Третман са GA3 довео је до повећања експресије у листу од 2,5 до 5 пута у зависности од концентрације, док је утицај на експресију у корену био занатно нижи (повећање од око 50 %). Третмани са 10^{-7} - 10^{-5} M ABA-е довели су до двоструког повећања броја транскрипата у корену, док на експресију у листу ABA није имала утицаја.



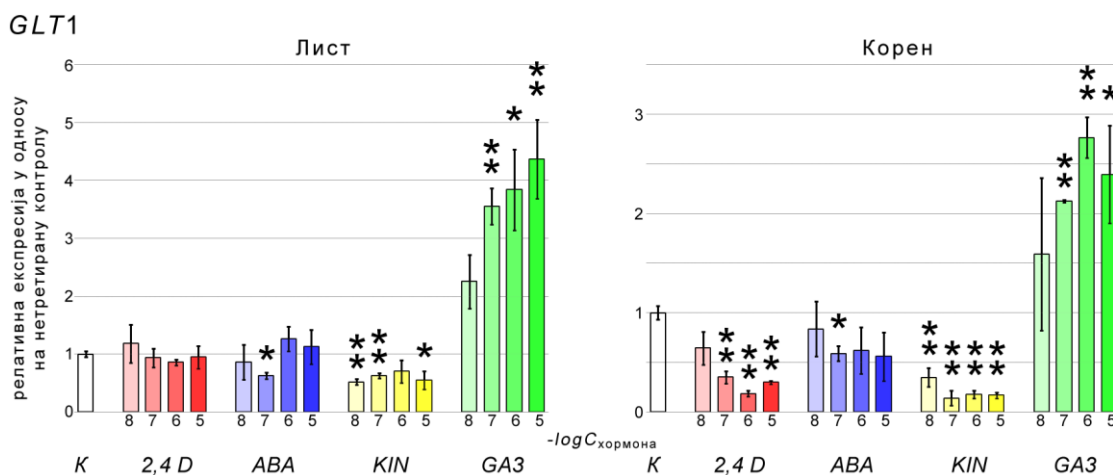
Слика 26: Релативна експресија *GLU1* гена при означеним третманима.

Третмани са KIN-ом, ABA-ом и 2,4-D-ом довели су до редукције експресије *GLU1* гена, док је третман са GA3 довео до повећања броја транскрипата у свим тестираним концентрацијама (10^{-8} - 10^{-5} M), при чему је максималан број транскрипата забележен при концентрацији од 10^{-7} M GA3. Експресија *GLU1* гена у корену није анализирана због јако ниског броја транскрипата при свим третманима.



Слика 27: Релативна експресија *GLU2* гена при означеним третманима.

На експресију *GLU2* гена у листу утицао је само третман са *ABA*-ом, која је прогресивно са повећањем концентрације стимулисала експресију *GLU2*, тако да је при највишој тестираној концентрацији од 10^{-5} M, број *GLU2* транскрипата био око 5,5 пута виши у односу на контролу. Нешто слабији је био утицај *ABA*-е на експресију у корену, где је само третман највишом концентрацијом стимулисао повећање броја транскрипата од око 2,5 пута. Третмани са *KIN*-ом и *2,4-D*-ом довели су до смањења броја транскрипата само у корену, при чему је ефекат *KIN* био израженији по амплитуди (14 % од контроле) и по опсегу концентрација (10^{-8} - 10^{-5} M).



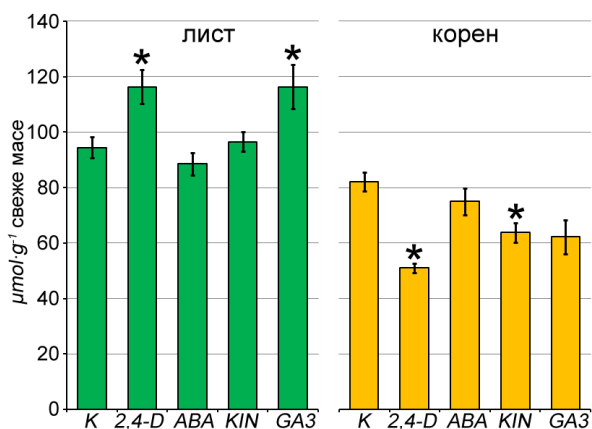
Слика 28: Релативна експресија *GLT1* гена при означеним третманима.

Третмани са *KIN*-ом и *2,4-D*-ом довели су до смањења броја *GLT1* транскрипата у корену у широком опсегу концентрација. Кинетин је био

ефикаснији, снижавајући експресију око 7 пута у односу на контролу, док је третман са 2,4-D довео до снижења броја транскрипата од око 5 пута. Нешто слабији ефекат третман са KIN-ом имао је на редукцију експресије *GLT1* у листу (50 % од контроле). Третман са GA3 изазвао је повећање броја *GLT1* транскрипата, око 4,5 пута у листу и око 2,5 пута у корену. Утицај 10^{-7} M ABA на снижење експресије у листу и корену, иако статистички значајан, треба узети са резервом, пошто је ово једина концентрација абсцисинске киселине које је имала ефекта.

4.4.1 Утицај третмана биљним регулаторима растења на садржај укупних слободних аминокиселина

Паралелно са испитивањем експресије *GS* и *GOGAT* гена код биљака третираних регулаторима растења, одређен је и садржај укупних слободних аминокиселина у листу и корену четири недеље старих биљака гајених у течној подлози, након 24 h излагања овим једињењима у финалној концентрацији од 10^{-5} M (Слика 29).



Слика 29: Садржај укупних слободних аминокиселина у листу и корену биљака третираних регулаторима растења: 2,4-D, ABA, KIN, GA3 у концентрацији 10^{-5} M, и нетретираних контролних биљака К. На графицима је приказана средња вредност три биолошка понављања од по 10 биљака са стандардном грешком. Значајност разлика је одређена Студентовим *t*-тестом и приказана са * ($p < 0,05$). Значајних разлика на $p < 0,01$ није било.

У листовима биљка третираним са 2,4-*D* и GA3 дошло је до повећања од 23 % у садржају укупних слободних аминокиселина у односу на нетретирану контролу, док третмани са ABA и KIN нису имали ефекта. У кореновима биљка третираним са 2,4-*D*-ом, дошло је до смањења од 38 % у садржају укупних аминокиселина у односу на нетретирану контролу, док је третман са KIN-ом довео до смањења од 22 %.

4.5 Селекција хомозиготних мутаната за Т-ДНК инсерцију у *GS* генима код *A. thaliana*

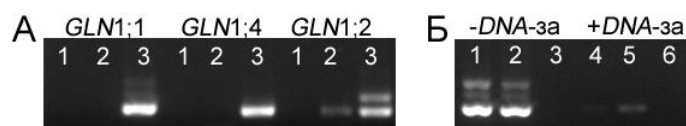
Током иницијалних експеримената, у различитим ткивима *A. thaliana* детектовано је више *GS1* изоформи него што је кодирано у геному. Ради провере да ли је ово проузроковано могућношћу различитих субјединица да формирају хетеромерне холоензиме, поређени су *GS* електрофоретски профили код различитих *GS1 knockout* мутаната *A. thaliana*. Очекивано је да код *knockout* мутанта у одређеном *GS1* гену неће бити детектоване све изоформе у чији састав улази одговарајућа субјединица. У циљу селекције *GS1 knockout* мутаната наручене су Т-ДНК инсерционе линије у *GS* генима из *SALK* и *SAIL* инсерционих библиотека. Како би се испољио одређени *knockout* фенотип, односно приметног недостатка одређених *GS* изоформи, потребно је било селектовати биљке код којих је Т-ДНК инсерција присутна у обе копије гена диплоидног генома, у позицији која омета генску функцију.

Све *SALK* и *SAIL* линије поседују одговарајуће гене за резистенцију на антибиотике (поглавље 1.6.1.1). У случају *SAIL* библиотека селективни маркер је *bar* ген (кодира фосфинотрицин-ацетилтрансферазу), што овим линијама пружа резистенцију на фосфинотрицин, а у случају *SALK* библиотека селективни маркер је *nptII* ген (кодира неомицин-фосфотрансферазу), што овим линијама пружа резистенцију на аминогликозидне антибиотике. Гајењем биљака на селективним хранљивим подлогама којима је додат канамицин или фосфинотрицин могуће је извршити селекцију оних биљака које садрже Т-ДНК инсерцију јер поседују одговарајући детоксикујући ензим, од *wt* биљака које нису у стању да детоксикују поменуте антибиотике. Како би се ово постигло две недеље старе

биљке T1 генерације хетерозиготних инсерционих линија пребачене су на хранљиве подлоге којим је додато $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ канамицина у случају *SALK* линија, односно $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ фосфинотрицина у случају *SAIL* линија. Недељу дана након пребацивања на селективне подлоге нешто више од половине биљака показивало је знаке пропадања као што су жути листови, губитак тургора и умањен раст. Све преживеле биљке су имале проблема са плодношењем, нису цветале и имале су дегенеративни раст. Пошто оваквом селекцијом није могуће разликовати хомозиготну биљку у T-ДНК инсерцији од хетерозиготне, инсерциони хомозиготи су даље селектовани искључиво РНК и ДНК маркерима.

4.5.1 Избор и оптимизација методе за брзу селекцију T-ДНК инсерционих мутаната РНК маркерима

У циљу успостављања брзе и поуздане методе за селекцију хомозиготних *knockout* мутаната изабрана су два приступа „*SucPrep*” и „*Touch and go*” (Berendzen и сар., 2005), која знатно убрзавају најспорији корак, изолацију нуклеинских киселина. Испитано је неколико варијанти ових приступа на дивљем типу *A. thaliana*: „*SucPrep*” без грејања, „*SucPrep*” са грејањем 10 минута на $100 \text{ }^\circ\text{C}$ и „*Touch and go*” са и без третмана дезоксирибонуклеазом, сва три праћена *RT-PCR*-ом (Слика 30А).



Слика 30: А - Поређење метода за брзу селекцију: 1 - „*SucPrep*” + *RT-PCR*; 2 - „*SucPrep*” + 10 min $100 \text{ }^\circ\text{C}$ + *RT-PCR*; 3 - „*Touch and go*” + *RT-PCR*; на слици је назначено који ген је амплификован. Б - „*Touch and go*” са и без третмана дезоксирибонуклеазом: 1 и 2 - „*Touch and go*” + *RT-PCR* са прајмерима за *GLN1;1*; 3 - контрола без матрице 4 и 5 - „*Touch and go*” + третман дезоксирибонуклеазом + *RT-PCR* са прајмерима за *GLN1;1*; 6 - контрола без матрице

Ампликони за три тестирана пара прајмера (за амплификацију *GLN1;1*, *GLN1;2* и *GLN1;4*) су детектовани након *RT-PCR*-а само у случају „*Touch and go*”

приступа (Слика 30А). У случају прајмера који су амплификовали гене који кодирају *GLN1;1* и *GLN1;2* детектовани су додатни фрагменти чија је величина одговарала ДНК ампликонима са одговарајућим прајмерима. Како би се избегла детекција ДНК ампликона, покушан је третман дезоксирибонуклеазом пре реверзне транскрипције, међутим то је довело да нестанка или знатног умањења сигнала након агарозне електрофорезе и детекције етидијум бромидом (Слика 30Б).

4.5.2 Селекција хомозиготних *knockout* мутаната „*Touch and go*” приступом

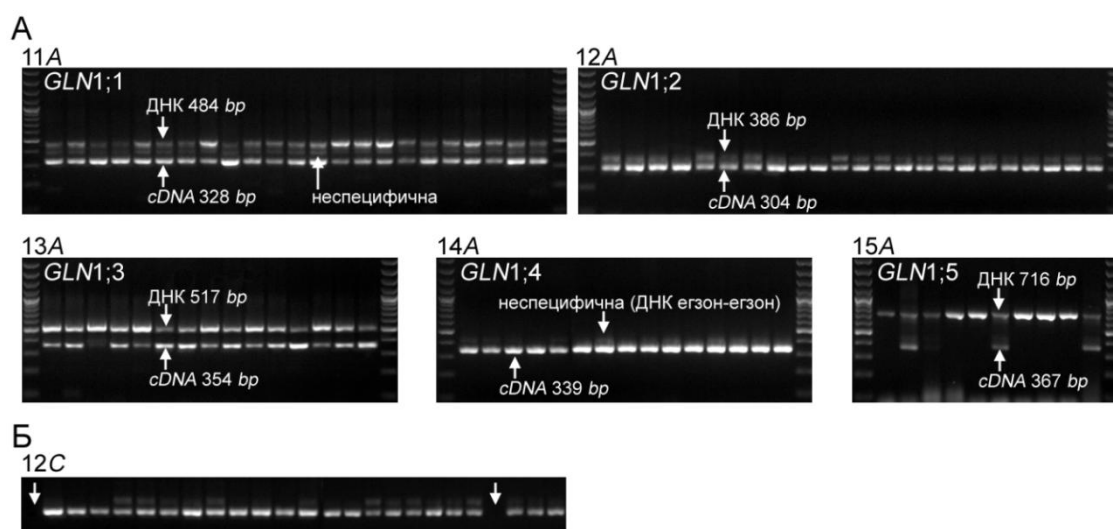
За селекцију хомозиготних Т-ДНК инсерционих мутаната одабран је „*Touch and go*” приступ без третмана дезоксирибонуклеазом. Због присуства фрагмената насталих услед амплификације ДНК, коришћени су парови прајмера који хибридују са секвенцама на различитим егзонима, при чему се добијају ДНК ампликони већи од *cDNA* ампликона (Табела 9). У случају *GLN1;4* гена, реверзни прајмер хибридизовао је са секвенцом у *cDNA* која се налази на споју два егзона тако да амплификација ДНК није могућа, јер не постоји секвенца комплементарна прајмеру



Слика 31: Изглед биљака непосредно пре „*Touch and go*” селекције.

Селекција „*Touch and go*” приступом урађена је на Т1 генерацији свих набављених Т-ДНК инсерционих линија (Табела 4). На слици 32А, приказани су

RT-PCR продукти одабраних Т-ДНК инсерционих линија. У случају *GLN1.5* гена, *cDNA* ампликони су примећени у малом броју случајева, вероватно због јако мале експресије *GLN1;5* гена (поглавља 4.3 и 4.4). Поред релативно великог броја тестираних биљака по Т-ДНК инсерционој линији (од 15-25), и четири линије по *GS* гену, само два потомка 12C линије (*SALK_102291*) нису имала одговарајуће *GLN1;2 cDNA* односно ДНК ампликоне, што је упућивало да су те биљке хомозиготи за инсерцију (Слика 32Б). Ово је било изненађујуће јер су 11A, 12A, 12D, 13A-D, 14A, 14D, 15A и 15D набављени као Т-ДНК инсерциони хомозиготи.

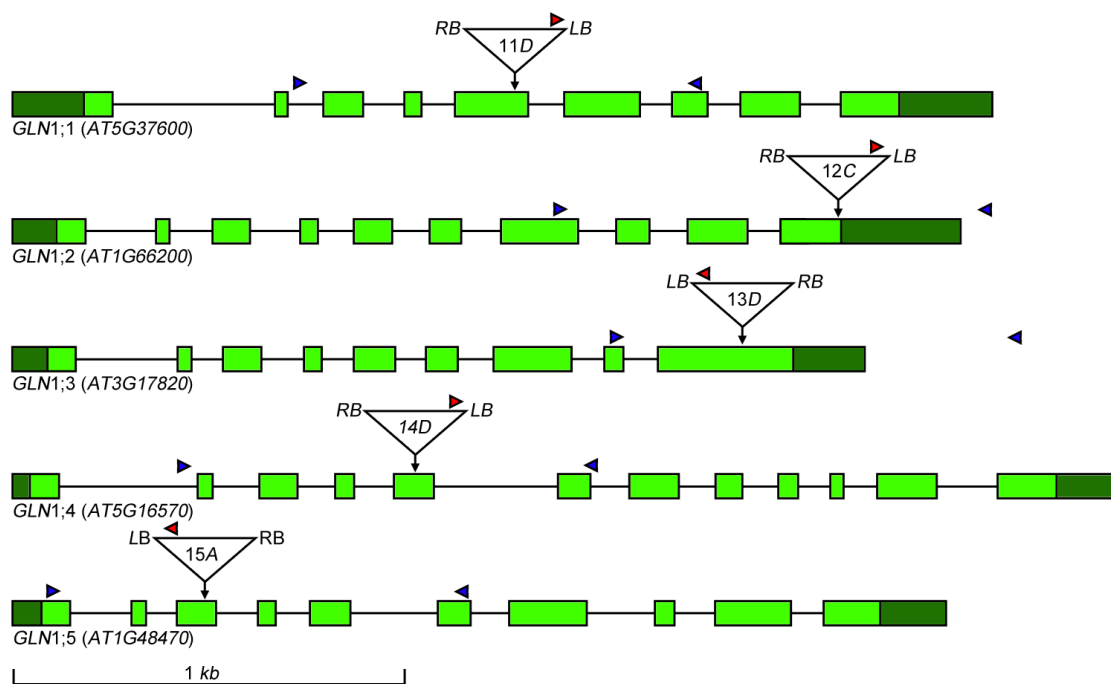


Слика 32: „Touch and go” - RT-PCR селекција биљака хомозиготних за Т-ДНК инсерцију: **А** - продукти амплификације након „Touch and go” - RT-PCR са одговарајућим прајмерима. **Б** - продукти амплификације након „Touch and go” - RT-PCR 12C инсерционе линије, стрелицама су обележени узорци у којима није детектовано присуство *GLN1;2 cDNA* односно ДНК.

4.5.3 Селекција хомозиготних мутаната на нивоу ДНК

Пошто селекцијом биљака „Touch and go” приступом нису изоловани хомозиготни *knockout* мутанти за све гене који кодирају цитосолне *GS* изоформе, дизајниран је систем за испитивање присуства и хомозиготности Т-ДНК инсерције у *GS* генима на нивоу ДНК. Селекција мутаната на нивоу ДНК базирала се на хипотези да прајмери који хибридују са секвенцама на ДНК између којих се налази Т-ДНК инсерција неће дати ампликон очекиване дужине у *PCR* реакцији. Односно, због дужине Т-ДНК инсерције (преко 4 *kb*) и лимита

коришћене полимеразе, није очекивана детекција овако дугачких ампликона приликом амплификације ДНК која садржи инсерцију. Дакле, два прајмера конструисана су да хибридишују са секвенцама, у или око одређеног GS гена на међусобној удаљености од 1000-1100 *bp*, између којих се налази Т-ДНК инсерција у одређеној инсерционој линији (Табела 4, Слика 33). Како би се повећала сигурност у присуство Т-ДНК инсерције у одговарајућој позицији, дизајниран је и трећи прајмер комплементаран секвенци левог граничника (*left boarder - LB*) Т-ДНК. Овај прајмер је у зависности од оријентације Т-ДНК, са једним од поменутих два GS прајмера током *PCR* амплификације требао да произведе фрагмент дужине 500-700 *bp* (Слика 33).

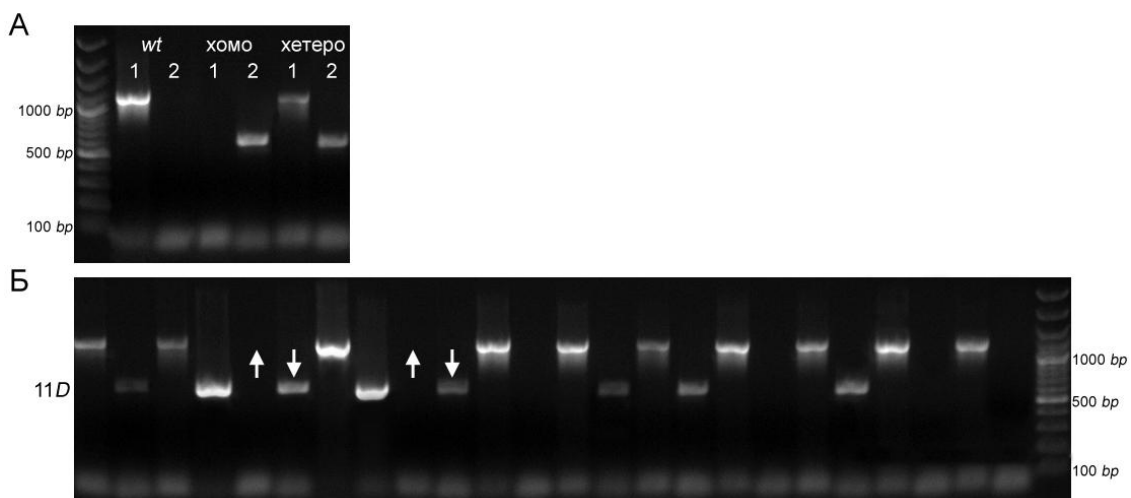


Слика 33: Структура GS1 гена *A. thaliana*. Приказани су интрони (црне линије), егзони (зелени блокови) и положај Т-ДНК инсерција у означеним инсерционим линијама: егзон 5 у GLN1;1 код 11D, егзон 10 у GLN1;2 код 12C, егзон 9 у GLN1;3 код 13D, егзон 5 у GLN1;4 код 14D и егзон 3 у GLN1;5 генау код 15A инсерционе линије. Плавим стрелицама су означене позиције секвенци са којима су хибридизовали прајмери специфични за GS гене, а црвеним стрелицама су обележене секвенце са којима су хибридизовали Т-ДНК специфични прајмери (Табела 10). RB – десни граничник Т-ДНК; LB – леви граничник Т-ДНК.

За селекцију је коришћена T1 генерација 11D, 12C, 13D, 14D и 15A инсерционих линија (Табела 4), за које је претпостављано да садрже Т-ДНК инсерцију у егзонима одговарајућих гена. Биљке су гајене две недеље на чврстој MS½ хранљивој подлози, након чега су узорковане откидањем по једног листа из розете и пребачене у засебне посуде на свеж хранљиви медијум. Из узоркованог ткива ДНК је изолована *mini prep CTAB* методом. ДНК изолат сваке биљке је тестиран у две PCR реакције, при чему је једна садржала *GS* прајмере за одговарајући ген, док је друга садржала *SALK* или *SAIL* (у зависности од порекла биљке) Т-ДНК *LB* прајмер и одговарајући *GS* прајмер. Очекивано је да Т-ДНК инсерциони хомозиготи произведу ампликон само у случају Т-ДНК *LB* + *GS* комбинације прајмера (500-700 bp), *wt* хомозиготи у случају *GS* + *GS* комбинације прајмера (1000-1100 bp), док је за обе комбинације прајмера очекивано да произведу одговарајуће ампликоне у случају хетерозиготне ДНК.

Систем селекције је проверен на изолованој ДНК из потенцијалног 12C хомозигота идентификованог „*Touch and go*” селекцијом, 12C хетерозигота и *wt* биљке (Слика 34А). Системом са три прајмера потврђено је да су изоловани потомци 12C инсерционе линије, који при „*Touch and go*” селекцији нису дали одговарајуће ампликоне, хомозиготи за Т-ДНК инсерцију (Слика 34А). Селекцијом потомства 11D инсерционе линије идентификоване су две биљке хомозиготне за Т-ДНК инсерцију (Слика 34Б). Потомство 13D, 14D и 15A инсерционих линија, које су набављене као хомозиготна семена, у попуности је било хомозиготно у првој генерацији (резултати нису приказани). При „*Touch and go*” селекцији ових Т-ДНК инсерционих линија све биљке су имале одговарајући *cDNA* ампликон, што указује да прајмери дизајнирани за брзу селекцију нису испуњавали улогу селектабилних маркера. Само у случају 12C инсерционе линије „*Touch and go*” селекција је открила две биљке које нису имале одговарајући *cDNA* ампликон. Ово се може објаснити опажањем да су једино „*Touch and go*” прајмери за *GLN1;2* хибридовали са секвенцама на *cDNA* и ДНК између којих се налази Т-ДНК инсерција код 12C инсерционе линије. Због овога су конструисани парови прајмера за *cDNA* амплификацију око Т-ДНК инсерције за 11D, 13D, 14D и 15A инсерционе линије (Табела 11). Прајмери су дизајнирани да хибридују са секвенцама на различитим егзонима тако да су производили ДНК и *cDNA*

ампликоне различите дужине, како би могли бити коришћени и при „*Touch and go*” селекцији.

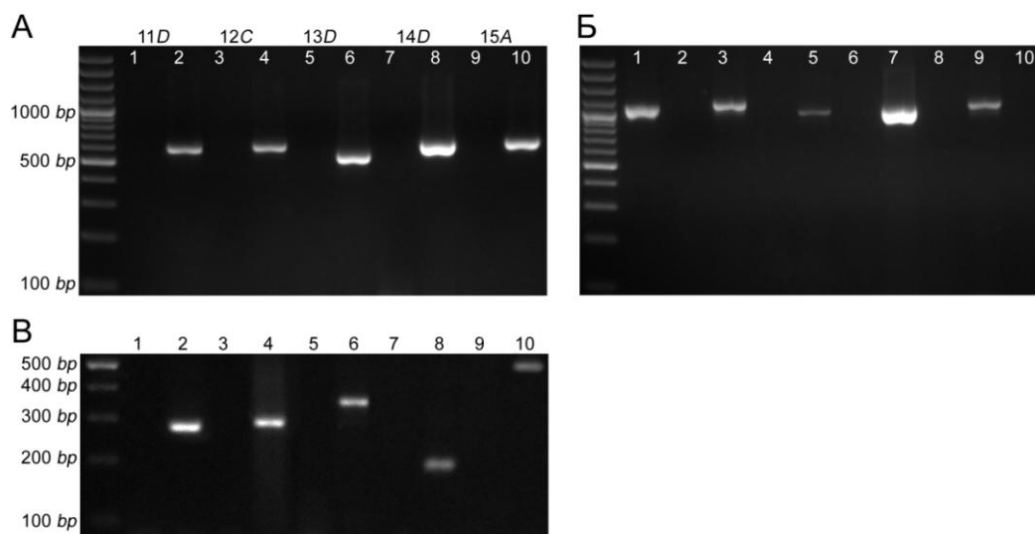


Слика 34: Селекција Т-ДНК инсерционих хомозигота на нивоу ДНК: **А** - PCR производи након амплификације ДНК изоловане из *wt* биљке, 12С Т-ДНК хомозигота и 12С Т-ДНК хетерозигота: **1** - 1;2ДНК *f + r*, **2** - *Salk LB + 1*;2ДНК *r*. **Б** - Селекција Т-ДНК инсерционих хомозигота у *GLN1;1* гену. Коришћена је прва генерација потомства 11D (*SAIL_86_B04*) инсерционе линије. Белим стрелицама означени су Т-ДНК инсерциони хомозиготи, односно ДНК узорци који нису дали ампликон при 1;1ДНК *f + r* комбинацији прајмера, а јесу при *Salk LB + 1*;1ДНК *r*.

Изоловане хомозиготне биљке су размножене (Слика 35) и њихово потомство проверено је системом са три прајмера на нивоу ДНК (Слика 36А), паралелно са *wt* биљком (Слика 36Б). Новоконструисани прајмери за амплификацију *GS cDNA* код мутаната (Табела 11) коришћени су да се верификује недостатак одговарајућег транскрипта (Слика 36В).



Слика 35: Изглед биљака које су након селекције идентификоване као хомозиготни мутанти за Т-ДНК инсерцију и остављене да плоносе.



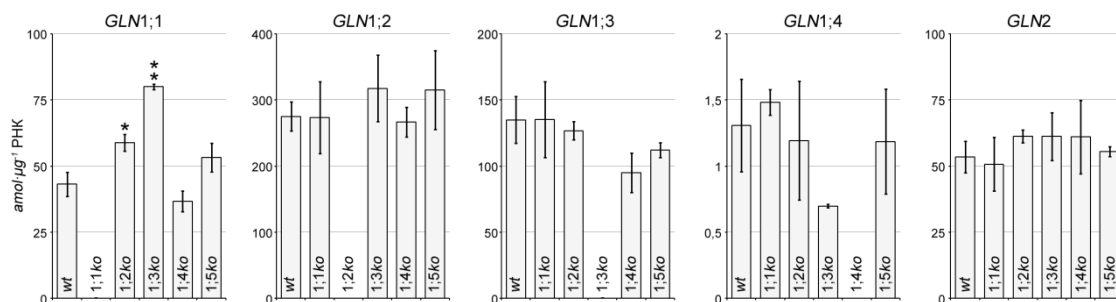
Слика 36: Провера хомозиготности Т-ДНК инсерције. **А** - PCR производи након амплификације ДНК изоловане из 11D, 12C, 13D, 14D и 15A хомозиготног потомства. Коришћене комбинације прајмера: **1** - 1;1ДНК *f* + *r*, **2** - *Salk LB* + 1;1ДНК *r*, **3** - 1;2ДНК *f* + *r*, **4** - *Salk LB* + 1;2ДНК *r*, **5** - 1;3ДНК *f* + *r*, **6** - 1;3ДНК *f* + *Salk LB*, **7** - 1;4ДНК *f* + *r*, **8** - *Salk LB* + 1;4ДНК *r*, **9** - 1;5ДНК *f* + *r*, **10** - 1;5ДНК *f* + *Salk LB*. **Б** - PCR производи након амплификације ДНК изоловане из *wt* биљке. Коришћене су исте комбинације прајмера као под **А**. **В** - RT-PCR производи након амплификације *cDNA* из: **1** - 11D хомозигота са 1;1РНК *f* + *r*, **2** - *wt* биљке са 1;1РНК *f* + *r*, **3** - 12C хомозигота са 1;2РНК *f* + *r*, **4** - *wt* биљке са 1;2РНК *f* + *r*, **5** - 13D хомозигота са 1;3РНК *f* + *r*, **6** - *wt* биљке са 1;3РНК *f* + *r*, **7** - 14D хомозигота са 1;4РНК *f* + *r*, **8** - *wt* биљке са 1;4РНК *f* + *r*, **9** - 15A хомозигота са 1;5РНК *f* + *r*, **10** - *wt* биљке са 1;5РНК *f* + *r* прајмерима.

Применом ДНК маркера селектовани су, или потврђени Т-ДНК инсерциони хомозиготи у свим *GSI* генима код *A. thaliana* (Слика 36А). Да Т-ДНК инсерције заиста ометају генску функцију показано је коришћењем РНК маркера (Слика 36В), којима је показано да мутанти не садрже одговарајуће транскрипте, а самим тим не могу садржати ни одговарајуће *GSI* протеине.

4.6 Експресија *GS* гена у *knockout* мутантима

Како би се испитала редундантност *GS* гена, односно да ли се недостатак одређеног *GS* гена компензује повећаном експресијом других, анализирана је експресија ових гена у хомозиготним *knockout* мутантима. Поред тога, ова анализа је представљала још једну проверу да изоловани *knockout* мутанти заиста не

производе одговарајуће транскрипте. За анализу експресије коришћени су две недеље стари клијанци хомозиготних 11D (*GLN1;1 knockout - 1;1ko*), 12C (*GLN1;2 knockout - 1;2ko*), 13D (*GLN1;3 knockout - 1;3ko*), 14D (*GLN1;4 knockout - 1;4ko*), и 15A (*GLN1;5 knockout - 1;5ko*) и *wt* биљака раслих на чврстој $MS\frac{1}{2}$ хранљивој подлози. РНК је изолована из целих биљака, реверзно-транскрибована и ниво експресије одабраних гена одређен *qPCR*-ом уз апсолутну квантификацију.



Слика 37: Поређење експресије *GS* гена у хомозиготним *knockout* мутантима (1;1ko - 1;5ko) и дивљем типу (*wt*). Представљена је средња вредност количине *GS* транскрипта ($\text{attol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ РНК) три биолошка понављања од по 3 биљке са стандардном грешком. Експресија *GLN1;5* није приказана, јер је због изузетно ниске количине транскрипта у ткиву прецизност квантификације била ниска, што се огледало у јако великој варијабилности међу понављањима. Значајност разлика је одређена Студентовим *t*-тестом и приказана са * ($p < 0,05$) и ** ($p < 0,01$).

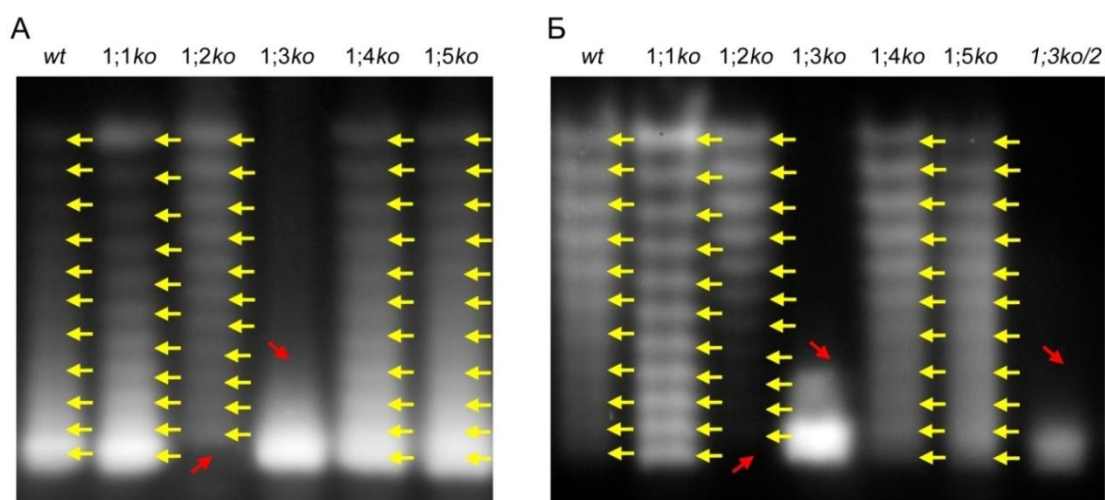
Као што се са слике 37 може приметити, нису уочене статистички значајне разлике у експресији *GLN1;2*, *GLN1;3*, *GLN1;4* и *GLN2* гена у различитим мутантима у односу на *wt* биљке. Експресија *GLN1;1* била је 35 % виша у *GLN1;2 knockout* мутанту (1;2ko) и 86 % виша у *GLN1;3 knockout* мутанту (1;3ko) у поређењу са дивљим типом.

4.7 Изоформски профили глутамин-синтетаза код *knockout* мутаната

Да би се одгонетнуо субјединични састав детектованих изоформи глутамин синтетазе код *A. thaliana*, поређени су изоформски профили изолованих *knockout* мутаната. Уколико одређени *knockout* мутанат заиста не производи функционалан *GS* протеин, очекивано је да сви *GS* холоензими у чијем се саставу

налази тај *GS* протеин не буду присутни у изоформском профилу поменутог мутанта.

За поређење изоформских профила коришћени су две недеље стари клијанци хомозиготних 11*D* (1;1*ko*), 12*C* (1;2*ko*), 13*D* (1;3*ko*), 14*D* (1;4*ko*), 15*A* (1;5*ko*) и *wt* биљака раслих на чврстој *MS* $\frac{1}{2}$ хранљивој подлози као и калуси ових линија. Нативном електрофорезом раздвојено је 11 изоформи код дивљег типа. Код *knockout* мутанта у *GLN1;1* (1;1*ko*) такође је раздвојено 11 изоформи, међутим може се приметити да већина изоформи, сем прве и последње, има различиту мобилност у поређењу са *wt* (Слика 38).



Слика 38: Поређење електрофоретских профила *GS* изоформи код *wt* биљка и *GS knockout* мутаната. **А** - клијанци стари две недеље. **Б** - калуси коренова. У бунариће је наливено по 100 μg укупних протеина по узорку, сем у случају 1;3*ko*/2 када је наливено 50 μg како би се елиминисала претерана преципитација фосфата уочена код узорка 1;3*ko*. Црвеним стрелицама су обележене изоформе које недостају код одређеног *knockout* мутаната, Жутим стрелицама је означен положај изоформи, односно разлике у мобилности изоформи код различитих узорака.

Knockout мутант у *GLN1;2* (1;2*ko*), не садржи изоформу највеће мобилности присутну код *wt*, али и поред тога код њега се јасно може разликовати 11 изоформи, првих пет исте мобилности као код *wt*, док су последњих шест нешто ниже мобилности. Највећу разлику у односу на *wt* показао

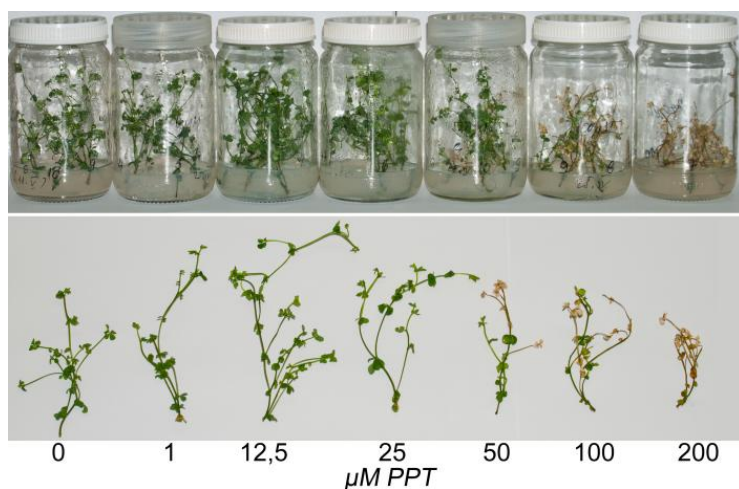
је *knockout* мутант у *GLN1;3* (1;3*ko*) код кога се примећује само једна волуминозна трака која обухвата простор приближан две последње изоформе код *wt*. *Knockout* мутанти у *GLN1;4* (1;4*ko*) и *GLN1;5* (1;5*ko*) нису показали разлике у изоформским профилима у односу на *wt*, што је било у складу са очекивањима због изузетно ниске експресије ових гена. Експресија *GLN1;4* гена је два до три реда величине мања у односу на *GLN1;1* - *GLN1;3* гене, док је експресија *GLN1;5* два до три реда величине мања у односу на *GLN1;4*.

4.8 Утицај ниских концентрација *PPT*-а на активност *GS* изоформи и раст биљка *L. corniculatus*

Због присуства пет *GSI* гена у геному и могућности детекције једанаест *GS* трака активности нативном електрофорезом, као и због тога што је геном секвенциран, *A. thaliana* је коришћена као модел-систем на коме је испитивана регулација експресије *GS* гена и за селекцију *GSI knockout* мутаната како би се утврдило које субјединице улазе у састав којих изоформи. За разлику од бројних ресурса и екстензивне литературе доступне приликом планирања и извођења експеримената везаних за *A. thaliana*, звездан је далеко мање проучавана биљка (само 211 секвенци, већином парцијалних, различитих *L. corniculatus* гена је депоновано у *GenBank*) и поред релативно високог потенцијала у пољопривреди. Звездан се у нашој лабораторији проучава као модел-легуминоза за оптимизацију метода регенерације, *in vitro* размножавања и за трансформације различитим генима за резистенцију, међу којима је и *bar* ген који пружа резистенцију на *PPT*. Током испитивања утицаја *PPT*-а на активност антиоксидативних ензима код *L. corniculatus* биљка које су садржале *bar* ген, примећено је да третман овим хербицидом има позитиван утицај на издуживање и гранање изданака (*Savić* и сар., 2010). Како би се проверило да ли је овај ефекат последица трансформације или је пак директна последица третмана *PPT*-ом, *wt* биљке су третиране сублеталним концентрацијама овог инхибитора и праћен је прираст биомасе као и ефекат ниских концентрација *PPT*-а на *GS* изоформе.

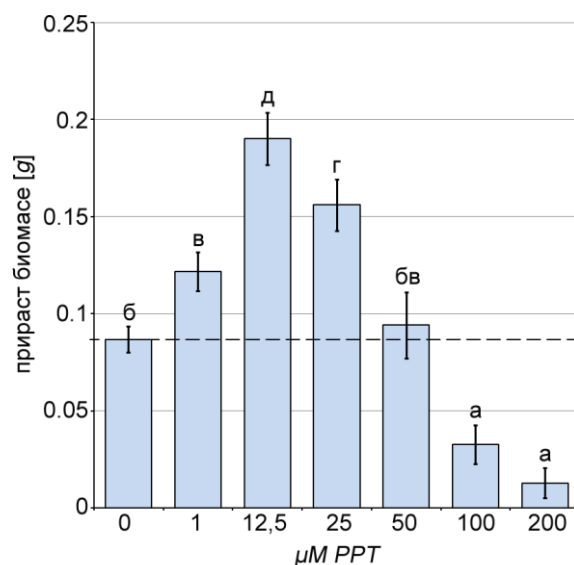
4.8.1 Утицај сублеталних концентрација *PPT*-а на прираст биомасе изданака *L. corniculatus*

Како би се испитало да ли постоји стимулаторни утицај сублеталних концентрација фосфинотрицина на раст *L. corniculatus*, три недеље стари изданци су третирани 5 минута различитим разблажењима *BASTA*[®]-е у води, која су садржала 1, 12,5, 25, 50, 100 и 200 μM *PPT*-а. Прираст биомасе одређен је као разлика масе изданака 15 дана након третмана и масе пре третмана хербицидом.



Слика 39: Изглед *L. corniculatus* биљака 15 дана након третмана разблажењима *BASTA*[®]-е која су садржала 1, 12,5, 25, 50, 100 и 200 μM *PPT*-а.

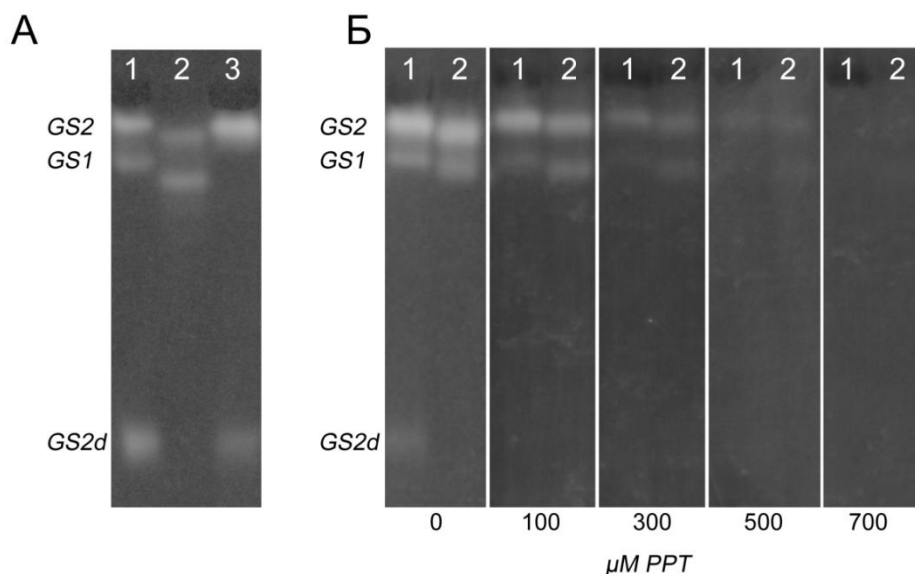
Биљке третиране разблажењима *BASTA*[®]-е која су садржала 12,5 и 25 μM *PPT*-а биле су приметно веће у односу на контролу, док су разблажења *BASTA*[®]-е која су садржала ≥ 50 μM *PPT* довела до пропадања биљака (Слика 39). Концентрација од 12,5 μM *PPT*, била је изразито стимулаторна, а биљке третиране овом концентрацијом добиле су у биомаси 119 % више од контроле (Слика 40). Овакав бифазни ефекат фосфинотрицина на прираст биомасе, стимулаторан у концентрацијама мањим од 50 μM , а токсичан при вишим концентрацијама може се класификовати као хормеза.



Слика 40: Утицај фосфинотрицина на прираст биомасе *L. corniculatus*. На хистограму су приказане средње вредности добијене мерењем масе 10 биљака по третману, са стандардном грешком. Значајност разлика утврђена је ANOVA-ом и *post hoc* Fisher LSD тестом ($p < 0,05$).

4.8.2 Електрофоретски профил GS изоформи код *L. corniculatus*

Како би се идентификовале хлоропластне и цитосолне GS изоформе и испитао утицај третмана *BASTA*[®]-ом, упоређени су електрофоретски профили GS изоформи биљке која није третирана хербицидом, изолованих хлороласта из нетретирне биљке и биљке третиране разблажењем *BASTA*[®]-е које је садржало 200 μM PPT пет дана након третмана (Слика 41А).



Слика 41: *GS* изоформе из *L. corniculatus*. **A** - Солубилни протеини екстраховани су из **1** - листова нетретиране биљке, **2** - листова биљака пет дана након третмана разблажењем *BASTA*[®]-е које је садржало 200 μM PPT, **3** - изолованих хлоропласта из нетретиране биљке, раздвојени нативном електрофорезом што је праћено детекцијом *GS* изоформи. На слици су приказане: хлоропластна изоформа - *GS2*, цитосолна изоформа - *GS1* и АТФ-азна активност велике мобилности - *GS2d*, такође присутна у хлоропласту; **B** - Потврда да су детектоване изоформе заиста *GS*, инхибицијом са PPT-ом који је додат у различитим концентрацијама у есеј за детекцију поред супстрата: **1** - листови нетретиране биљке, **2** - листови биљке третиране хербицидом.

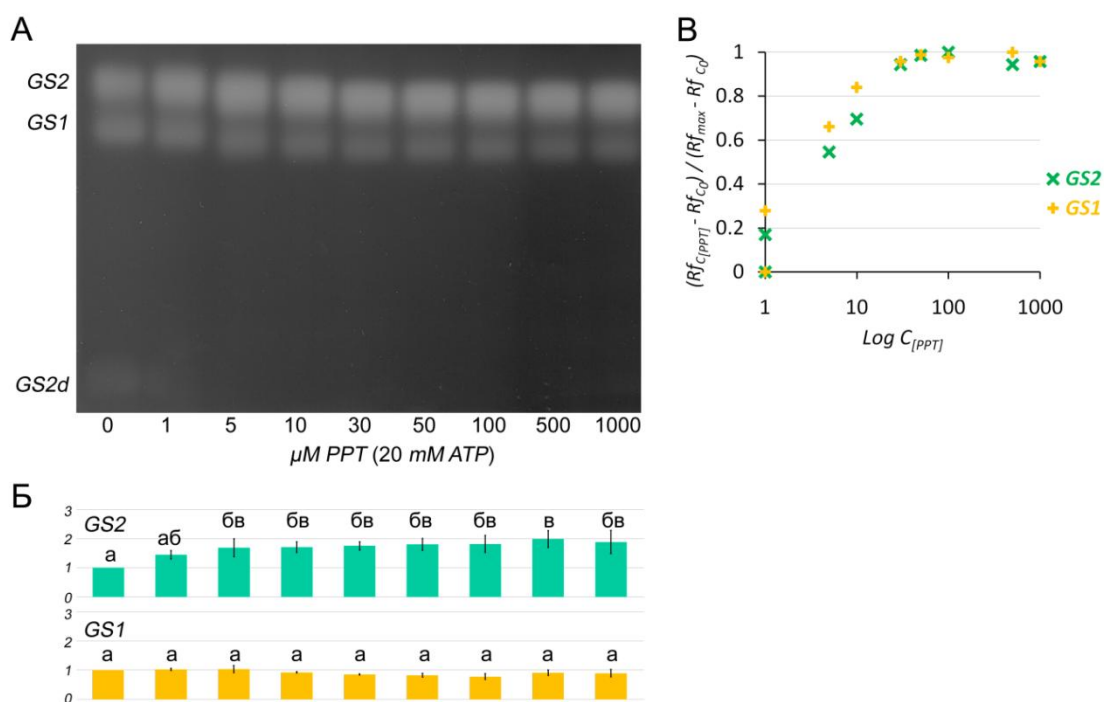
Код нетретиране биљке уочене су две *GS* активности очекиваних ретенционих фактора, од којих је изоформа ниже мобилности била присутна и у екстракту изолованих хлоропласта (*GS2*). Код биљака третираних хербицидом такође су уочене две *GS* активности са нешто вишом мобилношћу у односу на изоформе из нетретиране биљке. Због разлика у ретенционим факторима међу *GS* изоформама из третиране биљке и контроле није било јасно да ли су у питању различите изоформе, или је третман фосфинотрицином довео до промене мобилности. Код нетретираних биљака и у изолованим хлоропластима уочена је дифузна *GS* активност високе мобилности (*GS2d*). Ретенциони фактор овог ензима није одговарао очекиваном за *GS* (Слика 41А). Пошто се приликом *GS* есеја коришћеног овде детектује било каква АТФ-азна активност, како би се потврдило да уочене активности заиста потичу од *GS* изоформи, а нарочито како би се

проверила *GS2d* активност, у есеј су додате различите концентрације (0-700 *mM*) *PPT*-а. Све детектоване активности су биле осетљиве на додатак *PPT*-а, при чему је највећу осетљивост показала *GS2d* изоформа која је комплетно била инхибирана при 100 μM концентрацији *PPT*-а додатог у пуфер са супстратима (Слика 41Б). Висока мобилност и осетљивост на инхибицију *PPT*-ом *GS2d* изоформе, указала је на могућност да ова активност потиче од дисосованих субјединица *GS2* изоформе пошто су обе активности детектоване у протеинском екстракту хлоропласта.

4.8.3 Утицај *PPT*-а на мобилност и активност *GS* изоформи

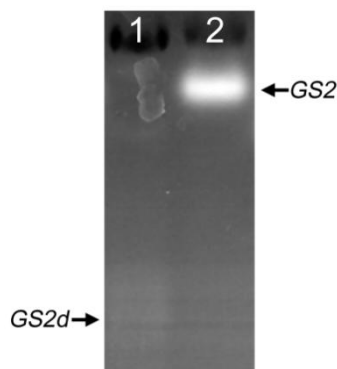
Како би се проверило да ли је везивање *PPT*-а за *GS* изазвало промену мобилности *GS* изоформи код биљака третираних хербицидом, у протеински екстракт нетретиране биљке додат је *PPT* у финалним концентрацијама од 1 до 1000 μM , и узорци су наливени на нативну електрофорезу, међутим никакве разлике између ових узорака нису детектоване (резултат није приказан). Пошто *PPT* постаје иреверзибилан инхибитор *GS*-а тек након фосфорилације од стране ензима (*Manderscheid* и *Wild*, 1986; *Logusch* и *cap.*, 1990; *Logusch* и *cap.*, 1991) и превођења у фосфинотрицин фосфат (*PPT-P*), претходни експеримент је поновљен уз додатак 20 *mM* *ATP*-а (Слика 42А). У овом случају детектована је промена мобилности *GS* изоформи, при чему је мобилност расла са порастом концентрације додатог *PPT*-а у опсегу од 1 до 30 μM , након чега је достигла плато и није се даље мењала са повећањем концентрације инхибитора (Слика 42А). Како би се квантификовала промена мобилности *GS* изоформи, уведена је величина названа релативна промена мобилности (Слика 42В), која је дефинисана са $(Rf_{\text{C[PPT]}} - Rf_{\text{C0}}) / (Rf_{\text{max}} - Rf_{\text{C0}})$, при чему је $Rf_{\text{C[PPT]}}$ - ретенциони фактор изоформе при одређеној концентрацији *PPT*-а, Rf_{C0} - ретенциони фактор изоформе у узорку без *PPT*-а и Rf_{max} - максимално измерен ретенциони фактор изоформе. Вредности ове величине крећу се од 0-1. За израчунавање релативне промене мобилности коришћени су денситометријски максимуми интензитета трака. Као што се примећује када се релативна промена мобилности прикаже у односу на логаритам концентрација *PPT*-а, мобилност обе изоформе расла је до 30 μM *PPT*, након чега је достигнут плато. Поред пораста мобилности *GS* изоформи,

додатак *PPT*-а у концентрацијама од 1 до 10 μM довео је и до пораста интензитета *GS2* изоформе, што је квантификовано денситометријски (Слика 42Б). Даљи пораст концентрације *PPT*-а није имао утицај на интензитет *GS2* изоформе. Интензитет *GS1* изоформе остао је непромењен без обзира на концентрацију *PPT*-а. Изненађујуће је било то што *PPT* ни у највишим концентрацијама није довео до опадања интензитета детектованих трака, што је очекивано од једног од најјачих ирверзибилних инхибитора овог ензима. Додатак 1 μM *PPT*-а довео је до нестанка *GS2d*.



Слика 42: Ефекат *PPT*-а додатог у протеински екстракт на електрофоретске профиле *GS* изоформи из *L. corniculatus*: **А** - Додатак *PPT*-а протеинском екстракту нетретиране биљке пре електрофорезе у концентрацијама од 1 - 1000 μM у присуству 20 mM *ATP*-а; **Б** - Денситометријска анализа *GS* активности; на графицима је приказана релативна средња вредност денситометријских мерења интензитета трака на три гела у односу на одговарајуће траке код узорка без *PPT*-а са стандардном грешком; слова изнад графика означавају статистички значајне разлике одређене *ANOVA*-ом и *post hoc Fisher LSD* тестом ($p < 0,05$); **В** - Релативна промена мобилности *GS* изоформи у зависности од логаритма *PPT* концентрације.

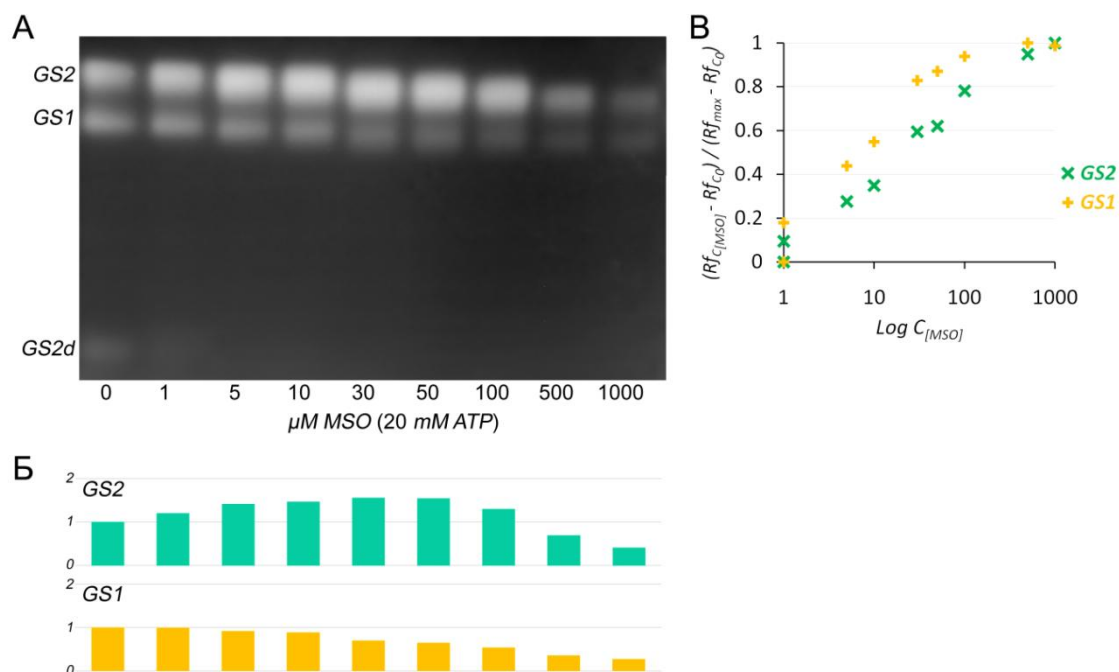
У неким протеинским екстрактима хлоропласта уопште није детектована *GS2* активност након замрзавања и одмрзавања екстракта већ само *GS2d* дифузна активност. Како би се проверило да ли *PPT* доводи до реасоцијације *GS2d* у *GS2*, односно да ли је ово делимично одговорно за опажену активацију *GS2* и нестанак *GS2d* активности приликом додатка *PPT*-а и *ATP*-а (Слика 42), у одмрзнути протеински екстракт хлоропласта у коме није детектована *GS2* активност додат је $10 \mu\text{M}$ *PPT* и 20mM *ATP* у финалним концентрацијама и тај узорак је пуштен на нативну електрофорезу (Слика 43). Додатак *PPT*-а и *ATP*-а протеинском екстракту хлоропласта довео је до успостављања *GS2* активности и нестанка *GS2d* траке што указује да ова два облика ензима постоје у равнотежи која се помера у страну *GS2* иреверзибилним везивањем инхибитора.



Слика 43: Реасоцијација *GS2d* у *GS2* у присуству $10 \mu\text{M}$ *PPT*-а и 20mM *ATP*-а: **1** – протеински екстракт хлоропласта након одмрзавања; **2** – као под **1** уз додатак $10 \mu\text{M}$ *PPT*-а и 20mM *ATP*-а и осталих компоненти неопходних за *GS* активност пре нативне електрофорезе

Да би се проверило да ли је активација и промена мобилности *GS* изоформи специфична за интеракцију са *PPT*-ом, за поређење је изабран структурно сличан инхибитор *MSO*. Додатак *MSO*-а у протеински екстракт нетретиране биљке у различитим концентрацијама у присуству *ATP*-а такође је довео до промене мобилности *GS1* и *GS2* изоформи (Слика 44А и В). Мобилност обе изоформе је расла са концентрацијом *MSO*-а. Интензитет *GS2* изоформе растао је са повећањем концентрације до $50 \mu\text{M}$ *MSO*, даље повећање концентрације *MSO* довело је до опадања интензитета ове траке (Слика 44Б).

Интензитет *GS1* изоформе опадао је са додатком *MSO* у целом концентрационом опсегу. Додатак $1 \mu\text{M}$ *MSO*-а довео је до нестанка *GS2d* изоформе.



Слика 44: *A* - Додатак *MSO*-а протеинском екстракту нетретиране биљке пре електрофорезе у концентрацијама од 1 - 1000 μM у присуству 20 *mM* *ATP*-а; *Б* - Денситометријска анализа гела; *В* - Релативна промена мобилности *GS* изоформи у зависности од логаритма *MSO* концентрације. Денситометријски максимуми интензитета трака су коришћени за калкулацију релативне мобилности.

Реверзибилност везивања *PPT*-а испитана је гел-филтрацијом у различитим пуферима. Фосфинотрицин је додат протеинском екстракту нетретиране биљке у финалној концентрацији од $50 \mu\text{M}$ уз 20 *mM* *ATP* и такви узорци су нанети на колоне за гел-филтрацију еквилибрисане са три пуфера:

1. 50 *mM* *Tris-HCl* *pH* 8, 1 *mM* *EDTA*.
2. пуфер са *GS* супстратима (20 *mM* натријум-глутамат, 20 *mM* *ATP*, 20 *mM* NH_4Cl , 20 *mM* MgCl_2 и 50 *mM* *KCl* у 100 *mM* *Tris-HCl*, *pH* 8) изабран како би се испитало да ли конкуренција за активно место може да доведе до дисоцијације везаног фосфинотрицина
3. кисели пуфер са високом јонском силом (1 *M* *KCl* и 0,4 *M* $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у 50 *mM* натријум-ацетату, *pH* 4.5) пошто је раније показано да *PPT-P* иреверзибилно

везан за *GS* из *E. coli* хидролизује на *PPT* и фосфат у киселим условима, што је потпомогнуто структурним пертурбацијама ензима које се дешавају при високој јонској сили (*Colanduoni* и *Villafranca*, 1986).

Колоне су елуиране истим пуфером којим су еквилибрисане и у сакупљеним фракцијама је испитана мобилност *GS* изоформи (Слика 45). Повећана мобилност изоформи је показана у свим фракцијама, што сугерише да ни један од тестираних пуфера није довео до дисоцијације инхибитора од ензима.



Слика 45: Протеинском екстракту нетретиране биљке додат је 50 μM *PPT* и 20 mM *ATP*, и затим је таквим узорцима уклоњен слободан *PPT* и промењен пуфер гел филтрацијом на *Sephadex G-25*. Сакупљане су фракције од 50 μl и анализиране за промене мобилности *GS* изоформи: **1 и 6** - протеински екстракт нетретиране биљке без додатка *PPT*-а ради поређења мобилности; **2** - фракција елуирана у 50 mM *Tris-HCl* pH 8, 1 mM *EDTA*. **3** - протеински екстракт хербицидом третиране биљке ради поређења мобилности; **4 и 5** - фракције елуиране у пуферу са *GS* супстратима; **7** - фракција елуирана у 50 mM натријум-ацетату, pH 4.5 са 1 M *KCl* и 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

5. Дискусија

5.1 Комбиновање нативне електрофорезе и денатуришуће електрофорезе са *western blot*-ом у испитивању *GS* изоформи

Нативна електрофореза пружа изузетно добру резолуцију при раздвајању *GS* изоформи пореклом из различитих биљних врста (Cai и Wong, 1989; Oliveira и сар., 2002; Simonović и сар., 2004; Betti и сар., 2006; Simonović и Anderson, 2007; Estivill и сар., 2010; Dragičević и сар., 2011; Dragičević и сар., 2012), што у комбинацији са чињеницом да су развијена два есеја за детекцију *GS* активности у гелу (Barratt, 1980; Simonović и сар., 2004), чине нативну електрофорезу методом избора при испитивању биљних *GS* изоформи. Код свих до сада испитиваних биљака, утврђено је да *GS1* субјединице имају масу од 38 - 40 *kDa*, а да молекулска маса *GS2* субјединица износи 44 - 45 *kDa* (Bernard и Habash, 2009). Код појединих биљака показано је да различите *GS1* субјединице поседују довољне разлике у маси да буду детектоване као различите траке након денатуришуће електрофорезе (Bennett и Cullimore, 1989; Temple и сар., 1996), те би комбинацијом нативне електрофорезе у првој димензији и денатуришуће електрофорезе праћене детекцијом специфичним антителима у другој, потенцијално могле да се дискриминишу хомомерне од хетеромерних *GS* изоформи. Како би се овакав приступ искористио за изоформе детектоване код *A. thaliana* покушана је екстракција протеина са нативних гелова након детекције. Независно од коришћеног пуферског система за екстракцију, *GS* субјединице или нису детектоване специфичним антителима, или су детектоване као агрегати виших маса, док су у мањем броју случајева, али нерепродуцибилно, добијани сигнали у очекиваној позицији на гелу. У циљу оптимизације овог приступа, одабран је спанаћ због малог броја *GS* гена и доступности биљног материјала. Установљено је да за успешну екстракцију детектованих изоформи са нативног гела избор екстракционог пуфера није од пресудног значаја, већ да је након детекције *GS* активности неопходно уклонити преципитован фосфат. Кисели *pH* нативног гела након детекције *GS* изоформи и присутни фосфатни комплекси молибдата ометају екстракцију протеина из гела и/или интерферирају са денатурацијом протеина детергентом. Због тога је након детекције *GS* изоформи

неопходна дужа еквилибрација у неутралном пуферу до потпуног нестанка трака активности, након чега је протеине могуће екстраховати са гела и анализирати у другој димензији.

Овим приступом је показано да молекулска маса субјединица које улазе у састав изоформи спанаћа детектованих у листу и хлоропласту износи 44 *kDa* (Слика 13Б), што је у складу са литературним подацима (*Ericson*, 1985), док је за изоформу детектовану у корену показано да се састоји од субјединица молекулске маса 40 *kDa* (Слика 13Б), што је у складу са предвиђеном масом за овај протеин на основу секвенце, која износи 39225 *Da*. Детекција две *GS2* активности са различитим мобилностима код спанаћа након нативне електрофорезе (Слика 13А) може се објаснити присуством различитих посттранслационих модификација, пошто све биљке поседују само један *GS2* ген (*Cren* и *Hirel*, 1999), те самим тим могу поседовати једну *GS2* изоформу. Присуство различитих *GS2* субјединица показано је код дувана (*Hirel* и сар., 1984), парадајза (*Migge* и сар., 1996; *Migge* и сар., 1998), шећерне репе (*Mäck* и *Tischner*, 1994; *Brechlin* и сар., 2000) и јечма (*Mäck*, 1995), и такође је приписано посттранслационим модификацијама које до данас нису идентификоване (*Migge* и сар., 1998; *Brechlin* и сар., 2000).

Применом наведеног приступа на *GS* изоформе из *A. thaliana* показано је да свих једанаест трака са детектованом активношћу које су раздвојене нативном електрофорезом (Слика 14Г) поседује субјединице чија молекулска маса износи 40 *kDa* (Слика 14Д), што упућује да у састав детектованих изоформи улазе искључиво *GS1* субјединице (*Ishiyama* и сар., 2004b).

Интересантно је да и поред високе експресије *GLN2* гена у листовима клијанаца гајених у течној подлози (Слика 16), активна *GS2* изоформа није детектована након нативне електрофорезе протеинског екстракта листова (Слика 14Д). Пошто *GS* активност није репродуцибилно детектована ни у протеинским екстрактима изолованих хлоропласта, могуће је да је *GS2* изоформа из *A. thaliana* нестабилна, или је на неки начин инхибирана у ткиву у зависности од услова гајења. Могуће да је ово и разлог зашто је *GLN2*, поред *GLN1;5*, једина *GS* изоформа из *A. thaliana*, која до сада није пречишћена и за коју кинетички

параметри нису одређени. Сем тога, иако постоје докази да је садржај *GS2* протеина, детектованог *western blot*-ом, у листовима *A. thaliana* виши или приближан садржају *GS1* протеина (*Diaz* и сар., 2008; *Lemaitre* и сар., 2008; *Lothier* и сар., 2011), утврђено је да већина укупне *GS* активности у листу потиче од *GS1* ензима (*Lothier* и сар., 2011). Ово се може објаснити уколико је специфична активност *GS1* ензима доста већа од *GS2*, за шта тренутно не постоје докази, или је *GS2* ензим на неки начин деактивиран у ћелији или денатуриран током екстракције. Утврђено је да *GS2* из *A. thaliana* интерагује са тиоредоксином, што указује на редокс регулацију активности овог ензима (*Motohashi* и сар., 2001; *Yamazaki* и сар., 2004; *Lindahl* и *Kieselbach*, 2009), а упућује и на евентуалну улогу два *Cys* остатка у активним центрима *GS2* који нису присутни код *GS1* изоформи (*Baima* и сар., 1989). У складу са овим је и опажање да реагенси који редукују дисулфиде, нарочито дитиотреитол знатно повећавају активност *GS2* изоформи (*Choi* и сар., 1999). Дитиотреитол је додаван у пуфере коришћене за екстракцију укупних протеина и изолацију хлоропласта у презентованим експериментима, међутим изгледа да присуство реагенса који редукују дисулфиде није довољан услов за детекцију *GS2* активности из *A. thaliana*. Могуће је и да је *GS2* изоформа из *A. thaliana* нестабилна, те да лако дисосује на субјединице. Слична ситуација опажена је за *GS2* изоформе код других биљка (*Mäck* и *Tischner*, 1994; *Betti* и сар., 2006), укључујући и *GS2* изоформу из *L. corniculatus* (Слика 43).

5.2 Експресија *GS* гена упућује да *GLN1;1*, *GLN1;2* и *GLN1;3* субјединице улазе у састав детектованих изоформи

Пошто је показано да су све детектоване *GS* изоформе из *A. thaliana* састављене од *GS1* субјединица (Слика 14Д), како би се проверило да ли сви типови *GS1* субјединица учествују у формирању добијеног зимограма (Слика 14Г) проверен је ниво експресије *GS* гена у различитим ткивима. На основу литературних података познато је да у условима када је азот доступан у подлози, *GLN1;4* и *GLN1;5* гени имају за неколико редова нижи ниво експресије у корену и листу од осталих *GS1* гена (*Ishiyama* и сар., 2004b; *Lothier* и сар., 2011). Количина *GLN1;4* и *GLN1;5* транскрипата у свим испитиваним ткивима била је на граници детекције и при условима гајења коришћеним у овом раду (Слика 16). Од *GS1*

гена, значајну експресију су имали *GLN1;1-1;3*. Највише транскрипата у корену и листу детектовано је за *GLN1;2*, што је у складу са литературним подацима (Ishiyama и сар., 2004b; Lothier и сар., 2011). У калусима се однос количина *GSI* транскрипата разликовао у поређењу са кореном и листом (Слика 16). Највиши ниво експресије имао је *GLN1;3* ген, а за њим су следили *GLN1;2* и *GLN1;1*. Код биљка третираних регулаторима растења (Слике 21-28) показано је да третман са *KIN*-ом доводи до снижења експресије свих *GS* гена, при чему је та репресија најслабија у случају *GLN1;3*, док третман са *2,4-D* доводи до репресије већине *GS* гена, осим *GLN1;3* гена који је индукован. На основу овога се може претпоставити да је однос *GSI* транскрипата у калусима последица гајења калуса на подлогама које садрже ове регулаторе растења.

Имајући у виду ниску количину *GLN1;4* и *GLN1;5* транскрипата у свим испитиваним ткивима (Слика 16) мало је вероватно да би изоформе у чији састав улазе *GLN1;4* и *GLN1;5* субјединице биле равноправно детектоване са изоформама у чији састав улазе *GLN1;1-1;3* субјединице приликом зимограмске детекције. У комбинацији са чињеницом да активна *GS2* изоформа није детектована при тестирањим условима гајења (Слика 14Д), главни кандидати који би могли да улазе у састав једанаест детектованих *GS* изоформи *A. thaliana* су управо *GLN1;1*, *GLN1;2* и *GLN1;3* субјединице.

5.3 Селекција *GSI knockout* мутаната *A. thaliana*

У циљу изоловања *GSI knockout* мутаната *A. thaliana* наручено је по четири Т-ДНК инсерциона мутанта за сваки *GSI* ген из *SALK* (Alonso и сар., 2003) и *SAIL* (McElver и сар., 2001; Sessions и сар., 2002) библиотека. Позиције Т-ДНК инсерција у *GSI* генима варирале су од егзона и интрона до промотора код различитих мутаната, а 11 од 20 наручених линија су биле означене као инсерциони хомозиготи (Табела 4). Селекција *knockout* мутаната закомпликована је чињеницом да отприлике половина линија генерисаних током *SALK* и *SAIL* пројеката поседује две или више инсерције у различитим позицијама у геному, при чему статус сегрегираних или хомозиготне линије не мора бити повезан са оном Т-ДНК инсерцијом за коју је положај одређен секвенцирањем. Дакле за све

мутантне линије била је потребна независна потврда положаја Т-ДНК инсерције. Поред тога, како би се испољио одговарајући *knockout* фенотип неопходно је да биљка буде хомозигот за Т-ДНК инсерцију у одговарајућем гену и да та инсерција омета функционалност гена. Другим речима, уколико једна копија гена у диплоидном геному не садржи Т-ДНК инсерцију, или уколико је Т-ДНК инсерција присутна у обе копије гена али у позицији која не омета функцију у значајној мери, онда ће протеински продукт гена бити присутан.

При иницијалној селекцији *GSI knockout* мутаната испитивано је присуство одговарајућих иРНК, *RT-PCR*-ом помоћу парова прајмера специфичних за различите *GS* транскрипте (Слика 32). Оваква селекција изведена је на Т1 генерацији биљка самооплођених мутантних линија, тако да је очекивано да одређен проценат потомства пореклом од хетерозигота за Т-ДНК инсерцију, као и сво потомство хомозигота за Т-ДНК инсерцију буде хомозиготно. Код хомозигота за Т-ДНК инсерцију није очекивана детекција одговарајућих *GSI cDNA* ампликона. Како би се максимално убрзао процес селекције одабран је „*Touch and go*” (*Berendzen* и сар., 2005) приступ који практично прескаче изолацију нуклеинских киселина која је уједно и најспорији корак. Резултати овакве селекције су били изненађујући. Од свих тестираних инсерционих линија, само у узорцима пореклом од два потомка 12С линије није детектован одговарајући *cDNA* ампликон, док су све остале биљке, било да су потомство сегрегирајућих или хомозиготних линија, поседовале одговарајуће ампликоне. Анализом резултата утврђено је да су парови прајмера конструисани за амплификацију *GLN1;2 cDNA* хибридовали са секвенцама на овом гену које се налазе око Т-ДНК инсерције код 12С линије, док су парови прајмера конструисани за амплификацију осталих *GSI cDNA* хибридовали са секвенцама на одговарајућим генима које се налазе са 3', односно 5' стране од Т-ДНК инсерције код тестираних линија. Овај резултат указује да Т-ДНК у значајној мери не омета транскрипцију гена у који је инсертована. Ипак, описаним приступом изоловане су две биљке које су биле потенцијални *knockout* мутанти за *GLN1;2*. Уз то, закључено је да селекција Т-ДНК инсерционих *knockout* мутаната на нивоу РНК мора бити извођена помоћу прајмер парова који амплификују секвенце унутар којих се налази Т-ДНК инсерција. Иако је у већини публикација, селекција Т-ДНК

инсерционих хомозигота извођена управо на овај начин, преглед литературе показује да ово ипак није апсолутно правило. Тако су на пример, приликом селекције Т-ДНК инсерционог хомозигота у *rapb/fln1* гену *A. thaliana* (Steiner и сар., 2011), коришћени парови прајмера који су амплификовали секвенцу на гену испред Т-ДНК инсерције. Занимљиво је да су приликом селекције *GLN1;2 knockout* мутанта из *SALK_102291* линије (Lothier и сар., 2011), која је коришћена и у овом раду (12C, Табела 4), употребљени парови прајмера амплификовали секвенцу на гену која се налази иза Т-ДНК инсерције, при чему одговарајући ампликон није детектован код хомозигота. Све ово упућује да ниво експресије гена који садржи Т-ДНК инсерцију зависи од структуре самог гена и позиције инсерције, те да се различити резултати могу добити у зависности од тога да ли парови прајмера хибридују са секвенцама иза, испред, или око Т-ДНК инсерције. За поуздане резултате препоручљиво је користити парове прајмера који амплификују *cDNA* секвенце унутар којих се очекује Т-ДНК инсерција.

У циљу селекције *knockout* мутаната за остале *GSI* гене присуство и позиција Т-ДНК инсерције прво је утврђена на нивоу ДНК. На овај начин селектовани су хомозиготи 11D линије, и потврђени су хомозиготи 12C, 13D, 14D и 15A линија (Слика 34). Употребом новоконструисаних прајмера који су хибридували са секвенцама на *GSI cDNA* између којих се налазила одговарајућа Т-ДНК инсерција, код селектованих хомозигота нису детектовани одговарајући транскрипти (Слика 36), што је значило да дате биљке заиста јесу *GSI knockout* мутанти.

5.4 Повећана експресија *GLN1;1* гена компензује недостатак *GLN1;2* и *GLN1;3* изоформи

Многи ензими који су укључени у различите метаболичке токове присутни су у ћелији у облику различитих изоформи. Ензими асимилације амонијум-јона нису изузетак (Lancien и сар., 2000). Чак и мали, неугледни коров, као што је *A. thaliana*, поседује пет *GSI*, три *GOGAT* и три *GDH* гена. Важно питање које још нема јасан и дефинитиван одговор је да ли различите изоформе (и које) имају преклапајуће (редундантне) или специфичне улоге. Гени који кодирају различите

изоформе ових ензима показују ткивно специфичну експресију и диференцијалну регулацију у одговору на спољашње услове (*Melo-Oliveira* и сар., 1996; *Coschigano* и сар., 1998; *Oliveira* и *Coruzzi*, 1999; *Lancien* и сар., 2002; *Ishiyama* и сар., 2004b), као и карактеристичне шеме експресије током развића (*Schmid* и сар., 2005), што упућује да производи ових гена обављају специфичне улоге. Са друге стране, *knockout* мутанти у многим од поменутих гена су успешно изоловани (*Melo-Oliveira* и сар., 1996; *Coschigano* и сар., 1998; *Lancien* и сар., 2002; *Lothier* и сар., 2011), а фенотипске разлике између њих и *wt* биљака су често, или недостајале, или примећиване тек при одређеним спољашњим условима. Ово сугерише да одређене изоформе показују специфичне улоге тек при одређеним физиолошким условима и процесима, док су у другим редундантне.

Како би се стекла почетна слика о томе да ли се недостатак одређених *GSI* изоформи код *GSIko* мутаната *A. thaliana* компензује повећаном експресијом других *GSI* гена, упоређена је количина *GS* транскрипата код различитих *GSIko* мутаната и *wt* (Слика 37). Сем тога, овај експеримент је представљао и дефинитивну потврду да су селектовани Т-ДНК хомозиготи заиста и *knockout* мутанти.

Код *knockout* мутаната није детектована експресија одговарајућих *GSI* гена са Т-ДНК инсерцијом, а у већини случајева се ниво транскрипата осталих *GS* гена код *ko* мутаната није разликовао у односу на *wt* (Слика 37). Само је у случају *knockout* мутаната у *GLN1;2* и *GLN1;3* детектовано статистички значајно повећање количине *GLN1;1* транскрипата код две недеље старих (14 *DAS* - *days after sowing*) биљака гајених у условима доступности азота. У случају *1;2ko* то повећање је било релативно мало, док је код *1;3ko* ниво *GLN1;1* транскрипата био скоро двоструко виши у односу на *wt*. Овај резултат упућује да у биљци постоје одређени регулаторни механизми који индукују експресију *GLN1;1* како би се компензовао недостатак у асимилацији азота проузрокован нефункционалним *GLN1;2*, односно *GLN1;3*. Претходно је код *GLN1;2 knockout* мутаната *A. thaliana* показано да се 36 и 64 дана након засејавања не детектују промене у експресији осталих *GSI* гена *A. thaliana* без обзира на концентрацију доступног азота у подлози (*Lothier* и сар., 2011). Према томе изгледа да компензаторни механизми

недостатка *GLN1;2* изоформе зависе од стадијума развоја биљке, и да су израженији у фази раног вегетативног раста. Биљке 14 дана након засејавања практично поседују само корен као орган извора и листове као орган увира, док се након 36 *DAS* ситуација знатно усложњава присуством зелених и сенесцентних листова као и цветова и семених заметака. Једини за сада описани регулатори експресије *GLN1;1* су концентрација амонијум-јона (*Ishiyama* и сар., 2004b), аминокиселина и простих шећера (*Oliveira* и *Coruzzi*, 1999) у подлози. Недавно је показано да код *GLN1;2 knockout* мутаната долази до нагомилавања амонијака у ткиву и повећања концентрације укупних аминокиселина (највише *Glu*, *Ala* и *Pro*) у условима доступности азота (*Lothier* и сар., 2011). Према овим резултатима очекивано би било смањење експресије *GLN1;1* код *GLN1;2 knockout* мутаната пошто и амонијум-јони и аминокиселине доводе до репресије *GLN1;1* гена (*Oliveira* и *Coruzzi*, 1999; *Ishiyama* и сар., 2004b). За разумевање регулаторних механизма који учествују у компензацији недостатка *GLN1;2* и *GLN1;3* свакако траба извести подробнију анализу експресије *GS* гена у различитим ткивима, фазама развића и условима гајења као и метаболичког статуса мутаната, што ће делом бити предмет будућих експеримената.

5.5 Коришћење *knockout* мутанта за одређивање субјединичног састава *GSI* изоформи *A. thaliana*

Како би се проверило да ли различите *GSI* субјединице код *A. thaliana* формирају хетеромере, и како би се утврдило које субјединице улазе у састав којих изоформи поређени су електрофоретски профили *GS* изоформи различитих *GSI knockout* мутаната. Очекивано је да код *knockout* мутанта у одређеном *GSI* гену неће бити детектоване све оне изоформе у чији састав улази недостајућа субјединица. Поред тога, на овај начин, не само да би се идентификовале хетеромерне изоформе, већ би се одредило које субјединице улазе у састав којих изоформи. Неколико додатних разлога је утицало да се користи управо овакав приступ. Због изузетне сличности *GSI* изоформи из *A. thaliana*, релативно мале количине *GS* протеина у биљном ткиву и мале продуктивности биљне биомасе, изузетно је тешко раздвојити различите изоформе током пречишћавања, како би се испитао субјединични састав пречишћених протеина електрофоретским

техникама. Коришћењем разрађених протокола за пречишћавање *GS*, *Ishiyama* и *cap.* (2004b) нису успели да раздвоје различите *GSI* изоформе из протеинског екстракта ћелијске културе *A. thaliana*, већ су се послужили хетерологом експресијом појединачних изоформи у *E. coli* како би окарактерисали кинетичке параметре пречишћених хомомерних изоформи. Тешко је уопште утврдити параметре за пречишћену *GS* изоформу. Техникама као што је *2D* електрофореза могуће је раздвојити *GSI* субјединице (*Cai* и *Wong*, 1989; *Brechlin* и *cap.*, 2000), али у случају детекције више сигнала, увек се може поставити питање да ли детектовани протеини потичу од једне хетеромерне изоформе или је почетни узорак садржао више хомомерних изоформи које нису раздвојене у претходним корацима сепарације. Сем тога, након *2D* електрофорезе пречишћене хомомерне *GSI* изоформе може се детектовати више сигнала услед присуства посттранслационих модификација. Различите *GSI* изоформе могу мигрирати као једна трака током нативне електрофорезе (*Simonović* и *Anderson*, 2007), тако да ни ово није одговарајући критеријум за дефинисање чистоће *GS* изоформи.

Пре упуштања у анализу резултата треба напоменути да је постојање хетеромерних *GSI* ензима показано код неколико биљних врста. Четири пика са *GS* активношћу раздвојена су јоноизмењивачком хроматографијом протеинског екстракта нодула *Phaseolus vulgaris* (*Bennett* и *Cullimore*, 1989), а *2D* електрофорезом је показано да у прва три пика елуирају изоформе које састоје од две различите *GSI* субјединице означене са β и γ . Изоформе које су елуирале у првом хроматографском пику садржале су више β субјединица, изоформе које су елуирале у другом пику биле су састављене од приближно подједнаких односа β и γ субјединица, док су изоформе које су елуирале у трећем пику биле састављене претежно од γ субјединица. Убрзо након овог експеримента, нативном електрофорезом је раздвојено девет нодуларних *GSI* изоформи код *P. vulgaris* и показано је да су изоформе са граничним мобилностима састављене искључиво од γ или β субјединица, док се изоформе са интермедијарном мобилношћу састоје од различитих односа γ и β субјединица (*Cai* и *Wong*, 1989). На основу овога аутори су закључили да γ и β субјединице могу да се комбинују у свим односима ($\gamma\delta$, $\gamma\beta 1\dots \gamma 1\beta 7$, $\beta\delta$) формирајући функционалне октамере који услед разлика у *pI* између γ и β субјединица поседују различите мобилности током нативне

электрофорезе. Данас, када се сматра да су еукариотске *GS* декамери, занимљиво би било поновити овај експеримент у покушају да се детектује једанаест нодуларних изоформи код *P. vulgaris*, пошто је то максималан број који две субјединице могу да формирају уколико се комбинују у свим односима приликом формирања декамера. Присуство хетеромерних *GSI* изоформи показано је и код *Glycine max* (Temple и сар., 1996) и *Beta vulgaris* (Mack, 1998; Brechlin и сар., 2000), међутим стехиометрија субјединица није утврђена. Такође је показано да две *GSI* изоформе - *a* и *b*, из *M. truncatula* које су пречишћене након хетерологе експресије у *E. coli*, могу *in vitro* да дисосују и реасосују формирајући хетеромерне изоензиме (Carvalho и сар., 1997). Иако поседује пет *GSI* гена који кодирају протеине високе хомологије (Табела 2), присуство хетеромерних *GS* изоформи није до сада испитивано код *A. thaliana*.

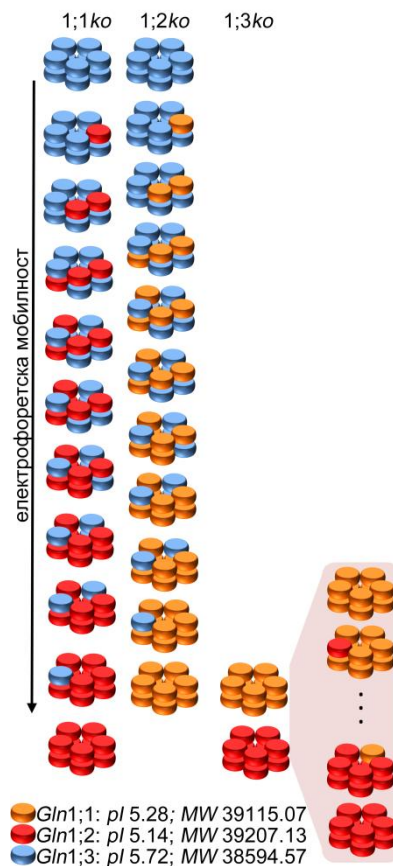
Поређењем електрофоретских профила *GS* изоформи различитих *GSI* *knockout* мутаната (Слика 38) утврђена је нешто комплекснија ситуација од првобитно антиципиране. Наиме, уместо недостатка појединих изоформи, код 1;1*ko* и 1;2*ko* мутаната је детектован исти број *GS* изоформи као код *wt*, а уочене су разлике једино у мобилности појединих изоформи. Највећу разлику у односу на *wt* показао је *knockout* мутант у *GLN1;3* (1;3*ko*), код кога је детектована само једна волуминозна трака која обухвата простор приближан две последње изоформе код *wt*. Код 1;4*ko* и 1;5*ko* нису детектоване разлике у изоформским профилима у односу на *wt*, највероватније због изразито ниске експресије *GLN1;4* *GLN1;5* гена у испитиваним ткивима *wt* биљака (поглавље 5.2). Једно од могућих објашњења за различиту мобилност детектованих изоформи код 1;1*ko*, 1;2*ko* и *wt* јесте да су то комплетно различите изоформе које се не састоје од истих субјединица.

Субјединице које улазе у састав *GSI* холоензима, имају блиску масу од око 40 *kDa* (Ishiyama и сар., 2004b) и веома сличну примарну стурктуру у којој разлику прави само пар аминокиселина (Слика 6). Тако мале разлике у примарној структури повлаче велике сличности у терцијарној структури. Претпоставља се да холоензими сачињени од ових субјединица имају исту кватернерну структуру. Дакле, хидродинамичке особине *GS* холоензима су јако сличне, а једина разлика

која би утицала на то да различито мигрирају у електричном пољу садржана је у тих пар аминокиселинских супституција које различитим субјединицама намећу различит pI , а самим тим и различиту количину наелектрисуња при условима електрофоретског раздвајања. Израчунат pI на основу секвенце за $GLN1;3$ износи 5,72, за $GLN1;1$ је 5,28, а за $GLN1;2$ је 5,14 (Табела 2). Иако се овај pI односи на развијену конформацију, вероватно је да би и у нативној конформацији редослед pI за ове протеине био исти због сличне терцијарне структуре. Према овоме, за хомомер састављен искључиво од $GLN1;3$ субјединица очекивана је најнижа мобилност при коришћеним електрофоретским условима, док би за $GLN1;2$ хомомер била очекивана највиша мобилност. Недостатак функционалног $GLN1;1$ гена (Слике 36 и 37), занемарљива експресија $GLN1;4$ и $GLN1;5$ гена (Слике 16 и 20), као и чињеница да активна $GLN2$ није детектована (Слика 14Д, Г), упућује да у састав детектованих изоформи код $1;1ko$ мутанта улазе само $GLN1;2$ и $GLN1;3$ субјединице. Пошто је у овом узорку детектовано 11 изоформи, што представља максималан број који две различите субјединице могу да формирају ако граде декамере, може се претпоставити да $GLN1;2$ и $GLN1;3$ могу да граде декамере у свим међусобним односима. Због веома сличне терцијарне структуре GS протеина и на основу претпоставке да је кватернерна структура за све GS декамере идентична, очекивано је да хомомери $GLN1;2_{10}$ и $GLN1;3_{10}$ имају граничне мобилности а да хетеромери $GLN1;2_nGLN1;3_{10-n}$ имају интермедијерне мобилности. Слична ситуација показана је за GSI изоформе пасуља (*P. vulgaris*), о чему је раније дискутовано (Cai и Wong, 1989). Уколико је претпоставка о мобилности холоензима на основу предвиђених pI GSI протеина тачна, онда би изоформи највише мобилности код $1;1ko$ мутанта одговарао састав $GLN1;2_{10}$. Пошто код $1;2ko$ мутанта није детектована изоформа са највишом мобилношћу, пристуна код *wt* и $1;1ko$ мутанта, претходно изнета претпоставка да овој изоформи одговара састав $GLN1;2_{10}$ чини се вероватном. Према томе, изоформи најниже мобилности код $1;1ko$ и $1;2ko$ мутаната одговарао би субјединични састав $GLN1;3_{10}$. Пошто $1;2ko$ мутант не садржи функционалан $GLN1;2$ ген (Слике 36 и 37), а експресија $GLN1;4$ и $GLN1;5$ гена је јако ниска (Слике 16 и 20), произилази да изоформе детектоване код овог мутанта садрже само $GLN1;1$ и $GLN1;3$ субјединице, те да изоформи највише мобилности вероватно одговара састав

GLN1;1₁₀. Изоформа са највишом мобилношћу код *1;2ko* (предложеног састава *GLN1;1₁₀*) има нешто спорију миграцију од изоформе са највишом мобилношћу код *1;1ko* (предложеног састава *GLN1;2₁₀*) што је у складу са очекивањима на основу предвиђених *pI* за одговарајуће протеине (Табела 2). Код *1;2ko* мутанта такође је детектовано 11 изоформи, што имплицира да *GLN1;1* и *GLN1;3* субјединице такође могу да граде декамере у свим међусобним односима. Према овоме, све детектоване изоформе код *1;1ko* и *1;2ko* мутаната, осим оних са највишом мобилношћу садрже *GLN1;3* субјединице. Ову претпоставку потврђује електрофоретски профил *GS* изоформи код *1;3ko* мутанта (Слика 38), где је детектована само једна волуминозна трака која обухвата простор који заузимају две најбрже мигрирајуће изоформе код *wt* односно код *1;1ko* и *1;2ko* мутаната. На основу изоформских профила *1;1ko* и *1;2ko* мутаната чини се да *GLN1;2₁₀* и *GLN1;1₁₀* изоформе поседују довољно различите ретенционе факторе да буду детектоване као две траке, тако да је могуће да *GLN1;1* и *GLN1;2* субјединице такође могу да граде холоензиме у различитим односима, који се због веома малих разлика у мобилности детектују као једна волуминозна трака (Слика 38). На основу изнетих закључака предложена је стехиометрија субјединица код *1;1ko*, *1;2ko* и *1;3ko* мутаната (Слика 46).

Пошто се ретенциони фактори различитих *GLN1;1-GLN1;3* и *GLN1;2-GLN1;3* хетеромерних изоформи делимично преклапају (Слике 38 и 46), субјединични састав *GSI* холоензима код *wt* је тешко предвидети. Изоформи са најнижом мобилношћу одговара састав *GLN1;3₁₀*, док је изоформа са највишом мобилношћу *GLN1;2₁₀*. Детектоване изоформе интермедијарне мобилности представљају декамерне холоензиме настале комбиновањем *GLN1;3* и *GLN1;2* односно *GLN1;3* и *GLN1;1*, а могуће и *GLN1;1* и *GLN1;2* у различитим односима. Субјединични састав неких од ових изоформи могуће је претпоставити поредећи њихову релативну мобилност са изоформама код *1;1ko* и *1;2ko* мутаната. Ипак слична мобилност између различитих хетеромерних изоформи отежава овакво поређење, а објашњава и слабу резолуцију између неких изоформи код *wt*, која настаје услед делимичног или потпуног преклапања појединих изоформи. Не може се искључити ни могућност да три или више различитих субјединица улазе у састав једног декамера.



Слика 46: Шематски приказ стехиометрије субјединица детектованих *GS* изоформи код *GSI* *knockout* мутаната у *GLN1;1* (1;1*ko*), *GLN1;2* (1;2*ko*) и *GLN1;3* (1;3*ko*). У случају 1;3*ko* приказана је и потенцијална могућност *GLN1;1* и *GLN1;2* субјединица да граде ензиме у свим односима. Шематски приказ састава изоформи код *wt* није приказан, а укључивао би све приказане комбинације код различитих *knockout* мутаната, уз могуће додатне комбинације проузроковане комбиновањем три различите субјединице у један холоензим.

Једна од импликација изнетих резултата и закључака је да су *GSI* изоформе из *A. thaliana* декамери, односно ово је један од главних услова неопходних за објашњење добијених резултата у контексту хетеромерних и хомомерних изоформи. *Ishiyama* и сар. (2004b) су гел-филтрацијом показали да маса нативних *GSI* ензима из *A. thaliana* износи 320-380 *kDa*, на основу чега су закључили да су то октамери. Овај закључак треба узети са резервом, јер све публикације у којима је на основу масе нативних ензима, или на друге начине пројектован број субјединица, упућују на октамерну структуру еукариотских *GS* (*McParland* и сар., 1976; *Pushkin* и сар., 1985; *Tholey* и сар., 1987; *Eisenberg* и сар., 2000; *Betti* и сар.,

2006; Llorca и сар., 2006), укључујући и нативне ензиме из кукуруза (*Sakakibara* и сар., 1996) и човека (*Boksha* и сар., 2002), за које је касније кристалографским студијама утврђено да су декамери - *PDB: 2D3A* и *2QC8* (*Unno* и сар., 2006; *Krajewski* и сар., 2008).

Презентовани резултати указују на могућност различитих *GSI* протеина *A. thaliana* да формирају хетеродекамере у свим стехиометријским односима. Ипак, за сада је прерано тврдити да се ово дешава и *in vivo*. Могуће је да се у одређеним типовима ћелија експримира само један *GSI* протеин, и да би физичка баријера у виду ћелијске мембране, онемогућила контакт различитих *GSI* субјединица, а самим тим и формирање хетеромера. Хомогенизацијом ткива различите *GSI* субјединице се доводе у контакт, што резултира детекцијом хетеромерних *GSI* холоензима. Ранија испитивања ткивно специфичне експресије *GSI* гена су показала да у епидермалним ћелијама корена постоји искључиво експресија *GLN1;1* гена (*Ishiyama* и сар., 2004b), тако да у овим ћелијама треба очекивати присуство *GLN1;1* хомодекамера. У ћелијама које граде васкулаторно ткиво корена високу експресију имају *GLN1;2* и *GLN1;3* гени (*Ishiyama* и сар., 2004b), тако да се у овим ћелијама могу очекивати хомо- и хетеромерне изоформе које садрже ове две субјединице. Чињеница да се и у екстрактима недиференцираних ћелија калуса након нативне електрофорезе детектује зимограм са 11 трака (Слике 14Г и 38Б), указује да се хетеромери вероватно формирају и *in vivo* у одређеним типовима ћелија.

Комбиновање различитих *GSI* субјединица у свим односима при формирању функционалних декамерних ензима упућује на велику пластичност која постоји у катализи асимилације амонијум-јона код *A. thaliana*. Такође, отвара се питање регулације настанка хетеромера и хомомера. Формирање различитих *GSI* изоформи може бити инхерентно за структуру субјединица и искључиво зависно од односа њихових концентрација у ћелији и међусобних афинитета. Међутим, не може се искључити ни могућност да је асоцијација субјединица регулисана додатним факторима. Поређењем електрофоретских профила *GS* изоформи (Слика 14Д) и експресије *GS* гена у калусу, корену и листу (Слика 16) примећује се да промена односа у експресији *GSI* гена доводи до промена у

интензитету детектованих *GS* трака. У листовима и кореновима, где је детектовано највише *GLN1;2* транскрипата (Слика 16), брже мигрирајуће изоформе имају виши интензитет трака (Слика 14Д). Према предложеној стехиометрији *GS* изоформи (Слика 46), брже мигрирајуће изоформе садрже виши однос *GLN1;2* у односу на *GLN1;3* субјединице. У калусима је детектовано највише *GLN1;3* транскрипата (Слика 16), а интензитет детектованих изоформи после нативне електрофорезе је био уједначен (Слика 14Г). Према стехиометрији субјединица у различитим *GS* изоформама предложеној овде, ензими са нижом мобилношћу имају виши садржај *GLN1;3* субјединица (Слика 46). Дакле, промене односа у експресији *GSI* гена доводе до промене односа формираних *GSI* холоензима што упућује да односи концентрација различитих субјединица одређују односе насталих хомо- и хотеродекамерних изоформи. Посттранслационе модификације утичу на стабилност појединих *GS* протеина код неколико биљних врста, спречавајући или доводећи до протеолизе (*Finnemann* и *Schjoerring*, 2000; *Lima* и сар., 2006а), што упућује да релативни однос концентрација *GSI* субјединица зависи и од овог фактора. Не треба одбацити ни могућност да одређене посттранслационе модификације утичу на афинитет одређених субјединица ка другим, и да се на тај начин регулише састав *GSI* изоформи.

Иако током ове студије нису изнети директни докази о хетеромерном саставу или стехиометрији детектованих *GS* изоформи код *Arabidopsis*-а, модел који приказује стехиометрију субјединица код детектованих *GS* изоформи (Слика 46) подржан је експерименталним резултатима и теоретским очекивањима на основу *pI GSI* протеина. Присуство различитих посттранслационих модификација може да утиче на електрофоретску мобилност ензима (*Richardson* и сар., 1988), а у случају *GS* изоформи из *L. corniculatus* иреверзибилно везивање инхибитора такође модификује електрофоретску мобилност (Слике 42 и 44). Ипак, мало је вероватно да би овакви фактори довели до промена у мобилности *GS* изоформи код испитиваних *GSIko* мутанта које би кохерентно подржавале одређени субјединични састав. Свакако је за финалну потврду изнете стехиометрије субјединица потребно испитати субјединични састав детектованих *GS* изоформи другим техникама. Једна од могућности је комбиновање нативне електрофорезе у

првој димензији са денатуришућим изолелектрофокусирањем праћеним детекцијом специфичним антителима у другој.

5.6 Експресија *GS* и *GOGAT* гена *A. thaliana* је диференцијално регулисана биљним регулаторима растења

С обзиром на значај *GS-GOGAT* циклуса у примарној и секундарној асимилацији азота, није изненађујуће да се већина истраживања која су се бавила регулацијом експресије *GS* и *GOGAT* гена фокусирала на утицај доступности азотних соли у подлози и светлости. Новија сазнања упућују на интеракцију различитих хормоналних путева сигнализације у контроли асимилације азота код виших биљка (*Kiba* и сар., 2011). У циљу формирања комплетније слике о хормоналној регулацији експресије *GS* и *GOGAT* гена *A. thaliana*, количина транскрипата ових гена је одређена у листу и корену биљака које су 24 h биле изложене различитим концентрацијама синтетичког цитокинина *KIN*-а, синтетичког ауксина *2,4-D*, *GA3* и *ABA*-е. Биљке су гајене у течном медијуму како би сва ткива подједнако била изложена одређеној концентрацији ових једињења, ради утврђивања што директније везе између одређеног третмана и експресије анализираних гена у датим ткива.

Поређењем нивоа *GS* транскрипата код контролних биљака које нису третиране регулаторима растења (Слика 20), запажају се сличне шеме између биљка гајених у течној култури и биљака гајених у чврстој култури у условима изобиља азота у подлози (*Ishiyama* и сар., 2004b; *Lothier* и сар., 2011). *GOGAT* гени такође су показали односе експресије (Слика 20) у складу са литературним подацима за биљке гајене на *MS* хранљивим подлогама (*Coschigano* и сар., 1998; *Lancien* и сар., 2002).

Излагање биљака различитим регулаторима растења довело је до диференцијалне репресије или индукције *GS* и *GOGAT* гена. Посматрајући утицај одређеног регулатора растења на експресију поменутих гена, могу се уочити одређене правилности. Тако је третман *KIN*-ом довео до репресије *GS* и *GOGAT* гена у корену, док у листовима нису опажене значајне разлике у експресији анализираних гена (Слике 21-28). Ово је у складу са очекивањима, односно са већ

предложеном улогом цитокинина у супресији преузимања и примарне асимилације азота (*Brenner* и сар., 2005; *Sakakibara* и сар., 2006; *Kiba* и сар., 2011). Нешто нижи ниво слободних аминокиселина у кореновима биљка третираним *KIN*-ом у односу на нетретиране биљке такође подржава изнету улогу цитокинина (Слика 29). Третман *KIN*-ом најслабији ефекат имао је на количину *GLN1;3* транскрипата у корену (Слика 23). Пошто је код биљака третираних *KIN*-ом репресија осталих *GS* и *GOGAT* гена у корену била далеко израженија, може се закључити да *KIN* поред супресије примарне асимилације азота у корену, такође доводи до усмеравања синтезе глутамин преко *GLN1;3* изоформе. Недостатак, или пак знатно нижи ефекти кинетина на експресију *GS* и *GOGAT* гена у листу у односу на корен могу се објаснити присуством различитих цитокининских рецептора (*AHK2*, *AHK3* и *CRE1/AHK4*) одговорних за сигнализацију у ова два ткива (*Higuchi* и сар., 2004; *Nishimura* и сар., 2004).

Третман *2,4-D*-ом произвео је сличне ефекте као *KIN*, снижавајући експресију *GS* и *GOGAT* гена у корену, са том разликом што је *2,4-D* имао ефекта на мањи број гена (само *GLN1;2* и *GLN2* од *GS* гена и све *GOGAT* гене), често тек при вишим концентрацијама (Слике 21-28). Према овоме може се закључити да ауксини и цитокинини имају делимично преклапајући улоге у регулацији експресије *GS* и *GOGAT* гена у корену *A. thaliana*, док је њихова улога у листу слабије изражена. Слични ефекти цитокинина и ауксина показани су и на експресију нитратних транспортера у корену *A. thaliana* (*Kiba* и сар., 2011), што такође упућује на преклапајуће улоге ових хормона у регулацији примарне асимилације азота у корену. Ипак, повећана количина *GLN1;3* транскрипата у корену и листу биљака третираних са *2,4-D*, упућује на одређене разлике у деловању ове две класе хормона и на евентуалну специјализовану функцију *GLN1;3* изоформе у условима појачане ауксинске сигнализације.

Третман са *GA3* далеко је запаженији утицај имао на експресију посматраних гена у ткиву листа, при чему су ефекти овог хормона искључиво били повећање експресије *GS* и *GOGAT* гена (Слике 21-28). О улози гиберелинске сигнализације у регулисању метаболизма азота се мало зна, и генерално ова класа хормона је ретко помињана у овом контексту. Гиберелини немају утицај на

експресију транспортера нитрата код *A. thaliana* (Kiba и сар., 2011), што упућује да не играју улогу у регулацији преузимања азота из подлоге. У складу са много већим променама у експресији *GS* и *GOGAT* гена које су уочене у листу, може се закључити да *GA3* има потенцијалну улогу у регулацији секундарне асимилације амонијум-јона. Повишена концентрација слободних аминокиселина у листовима биљака третираних са *GA3* (Слика 29) такође подржава овакву улогу. Фотореспирација је метаболички процес при коме се амонијак ослобађа у највећим количинама у фотосинтетски активним ткивима (Keys и сар., 1978). Ослобођени амонијак се у листовима асимилије *GS2-GOGAT* циклусом, тако да није изненађујуће да су управо гени *GLN2* и *GLU1* који кодирају *GS2* и *Fd-GOGAT* изоформу са највишом експресијом у листовима *A. thaliana*, позитивно регулисани светлошћу кроз активност фитохрома (Edwards и Coruzzi, 1989; Coschigano и сар., 1998). Занимљиво је да је експресија *GS1* гена такође позитивно регулисана светлошћу кроз процесе који не укључују активност фитохрома (Oliveira и Coruzzi, 1999), што упућује да и *GS1* изоформе учествују у секундарној асимилацији амонијака ослобођеног током фотореспирације. Значај *GS1* изоформи у овом процесу показан је код трансгених биљака дувана са повишеном експресијом *GS1* изоформе у паренхимским ћелијама листа (Oliveira и сар., 2002). Имајући у виду међусобну испреплетаност путева трансдукције сигнала гиберелина и фитохрома (Davière и сар., 2008; de Lucas и сар., 2008; Feng и сар., 2008) и чињеницу да је биосинтеза гиберелина позитивно регулисана светлошћу кроз активност фитохрома (Toyomasu и сар., 1998; Yamaguchi и сар., 1998; Kamiya и Garcia-Martinez, 1999; Oh и сар., 2006; Sawada и сар., 2008), као и на основу резултата приказаних у овој тези, примамљиво је спекулисати о гиберелинској киселини као додатним учесником у регулацији експресије *GS-GOGAT* циклуса у листовима, са улогом у повећању капацитета за реасимилацију токсичног амонијака ослобођеног током фотореспирације у фотосинтетски активним ћелијама

Третман *ABA*-ом довео је до повећане експресије појединих гена у листу, корену или у оба ткива (Слике 21-28). Утицај *ABA*-е на експресију и активност *GS* и *GOGAT* ензима није испитиван до сада, те да би се разумео могући физиолошки контекст индукције *GS* и *GOGAT* гена код биљка *A. thaliana* третираних са *ABA*-

ом, потребно је потражити индиректну везу. Сматра се да је *ABA* главни хормон одговоран за промене у транскрипционој машинерији биљне ћелије у одговору на абиотички стрес. У условима суше и сланог стреса долази до повећања ендогеног садржаја *ABA*-е која потом доводи до смањења нивоа транспирације и акумулације осмопротектаната у ћелији (*Wilkinson* и *Davies*, 2002; *Tuteja*, 2007). У биљкама третираним *ABA*-ом индукују се слични процеси у ћелијама, као и у случају дејства неповољних абиотичких фактора (*Tuteja*, 2007). Код многих биљних врста опажено је повећање експресије и активности *GS* и *GOGAT* ензима у условима суше и сланог стреса (*Berteli* и сар., 1995; *Lutts* и сар., 1999; *Santos* и сар., 2004; *Yan* и сар., 2005; *Wang* и сар., 2007). И код *A. thaliana* је детектована акумулација *GS* протеина у корену биљка изложених сланом стресу (*Jiang* и сар., 2007). Повећана активност *GS-GOGAT* циклуса у условима сланог стреса и суше објашњена је повећаном потребом за биосинтезом пролина (*Berteli* и сар., 1995), једног од најчешћих осмопротектаната у биљној ћелији, који настаје од глутамата у три ензимски каталисане реакције (*Yoshida* и сар., 1997). Значај *GS* за биосинтезу пролина показан је код трансгених биљка дувана са смањеном активношћу овог ензима, које су биле драстично осетљивије на слани стрес услед умањеног капацитета за синтезу овог осмопротектанта (*Brugière* и сар., 1999). Све ово упућује на улогу *ABA*-е као медијатора сигнала који индукује експресију одговарајућих *GS* и *GOGAT* гена при одговору биљке на абиотички стрес. За потврду ове претпоставке потребно је утврдити да ли се исти *GS* и *GOGAT* гени (*GLN1;1*, *GLN1;3*, *GLN2* и *GLU2*), чија је експресија виша код биљака третираних *ABA*-ом, индукују и када се биљке изложе сланом стресу или суши.

5.7 Мале дозе *PPT*-а повећавају активност и стабилност *GS2* што се позитивно одражава на прираст биомасе код *L. corniculatus*

Од недавно се алтернативни ефекти хербицида при субтоксичним дозама све више испитују пошто представљају један од начина за повећање приноса пољопривредних култура (*Cedergreen* и сар., 2007; *Cedergreen*, 2008; *Belz* и сар., 2011). Међутим, недостатак литературе о могућим механизмима којима хербициди доводе до стимулације раста, као и генерална сумњичавост која

постоји према феномену хормезе (*Kaiser*, 2003) спречавали су ширу, практичну употребу ових супстанци.

Током опсежног испитивања утицаја широког опсега концентрација различитих хербицида на четири биљне врсте показано је да највећи стимулаторни утицај на анализирани параметре имају ниске концентрације глифозата и метсулфурон-метила (*Cedergreen* и сар., 2007). Оба хербицида инхибирају синтезу аминокиселина. Глифозат инхибира ензим 5-енолпирувилшкимат-3-фосфат-синтазу (*EC* 2.5.1.19), која каталише једну од првих реакција у биосинтези ароматичних аминокиселина (*Steinrücken* и *Amrhein*, 1980), док метсулфурон-метил инхибира ацетолатат-синтазу (*EC* 2.2.1.6), која каталише први корак у биосинтези аминокиселина са рачвастим низом (*Ray*, 1984). Уколико је индукција, односно стимулација хормезе код биљака повезана са инхибицијом синтезе аминокиселина, као што су предложили *Cedergreen* и сар. (2007), онда је очекивано да *PPT*, хербицид који инхибира *GS*, односно почетни ступањ биосинтезе свих аминокиселина, индукује значајан хорметички ефекат.

Приликом испитивања утицаја третмана *PPT*-ом на биљке *L. corniculatus* које су садржале *bar* ген, примећен је позитиван ефекат овог хербицида на издуживање и гранање трансформисаних изданака (*Savić* и сар., 2010). Како би се утврдило да ли је овај ефекат последица трансформације или самог третмана хербицидом, испитан је утицај различитих разблажења *BASTA*[®]-е на раст *wt* изданака *L. corniculatus*. У опсегу концентрација *PPT*-а од 1 до 50 μM биљке су добијале значајно више на биомаси у односу на контролне изданке (Слика 40). Слични стимулаторни ефекти сублеталних концентрација *PPT*-а на различите процесе и параметре раста показани су и код других врста (*Kamo* и *van Eck*, 1997; *Hoshino* и *Mii*, 1998; *Evstigneeva* и сар., 2003). Пошто је *GS* за сада једина позната мета деловања *PPT*-а и пошто се сматра да токсични ефекти излагања овом хербициду потичу искључиво од инхибиције *GS* (*Wendler* и сар., 1990; *Hoerlein*, 1994), постављено је питање да ли су и опажени стимулаторни ефекти такође у вези са *GS*.

У протеинском екстракту листова *L. corniculatus* детектоване су три *ATP*-азне активности које су биле осетљиве на *PPT*, на основу чега је закључено да потичу од *GS* изоформи (Слика 41). Две изоформе су биле очекиваних мобилности за *GS*, док је трећа, обележена са *GS2d*, била изузетно високе мобилности. Поређењем електрофоретских профила *GS* изоформи листа и хлоропласта, идентификоване су две хлоропластне изоформе, обележене *GS2* и *GS2d*. Према томе, једина преостала активност која није била присутна у хлоропластима потиче од цитосолне *GS1* изоформе. Код филогенетски блиске врсте *L. japonicus* након нативне електрофорезе такође су детектоване једна *GS1* активност и једна *GS2* активност, при чему је *GS2* изоформа имала нижу мобилност (*Betti* и сар., 2006). Поред активних *GS1* и *GS2* олигомера *Betti* и сар. (2006) су након *western blot*-а нативних гелова детектовали и *GS* протеин велике мобилности, који највероватније представља *GS2* тетрамер без активности, пошто је детектован и у протеинским екстрактима хлоропласта. Ово наводи на закључак да *GS2d* изоформа код *L. corniculatus* такође представља дисоцијациони продукт *GS2* изоформе (тетрамер или пентамер ако су ензими декамерни) који, за разлику од тетрамера из *L. japonicus*, задржава активност. Присуство *GS* изоформи високе мобилности након нативне електрофорезе показано је код неколико биљних врста (*Mäck* и *Tischner*, 1994; *Temple* и сар., 1996; *Brechlin* и сар., 2000) и увек је тумачено у контексту дисоцијације *GS* октамера на тетрамере. У протеинским екстрактима листова *B. vulgaris* однос *GS2* октамера и тетрамера је варирао са стадијумом развоја листова (*Mäck* и *Tischner*, 1994), што сугерише да је дисоцијација *GS2* регулисан процес и од физиолошког значаја у биљци. Дисоцијација *GS* детектована је и код изоформе из мозга овце (*Denman* и *Wedler*, 1984), за коју је показано да тече у два „све или ништа” ступња, октамер у тетрамер и тетрамер у мономер. Пошто кристалне структуре еукариотских *GS* упућују на декамерни састав (*Unno* и сар., 2006; *Krajewski* и сар., 2008; *Seabra* и сар., 2009), а имајући у виду слабе интеракције уочене између пентамерних прстенова код декамерних ензима (*Unno* и сар., 2006), вероватно је да све литературне податке о дисоцијацији *GS* октамера у тетрамере треба посматрати као дисоцијацију *GS* декамера у пентамере.

За разлику од контролних биљака *L. corniculatus*, у листовима биљака третираних са *BASTA*[®]-ом није детектована *GS2d* изоформа. Две детектоване *GS* активности имале су нешто вишу мобилност у поређењу са *GS* изоформама из листова нетретираних биљака (Слика 41).

Како би се проверило да ли везивање *PPT*-а за ензиме доводи до пораста мобилности *GS* изоформи, урађен је *EMSA* (*electrophoretic mobility shift assay*) експеримент којим је испитана мобилност *GS* изоформи у протеинским екстрактима нетретиране биљке, помешаним са варирајућим концентрацијама *PPT*-а, са или без *ATP*-а. У присуству *ATP*-а, додаток *PPT*-а довео је до концентрационо зависног повећања мобилности обе *GS* изоформе, до одређене граничне концентрације. Са додатним повећањем концентрације *PPT*-а даље промене у мобилности нису детектоване (Слика 42А). Поред промена у мобилности, повећање концентрације *PPT*-а, додатог у протеински екстракт пре електрофорезе, довело је до појачања интензитета *GS2* траке, док је интензитет *GS1* траке остао непромењен (Слика 42Б). Чињеница да је промена мобилности *GS* детектована само у присуству *ATP*-а и то при ниским концентрацијама *PPT*-а има три импликације: *PPT* се вероватно везује за активне центре, а не алостерично; везивање *PPT*-а за ензим је иреверзибилно при ниским концентрацијама инхибитора; *PPT* се везује иреверзибилно само за неке активне центре на ензиму. Промена мобилности *GS* изазвана *PPT*-ом детектована је само у присуству *ATP*-а што указује да ензим фосфорилује *PPT*, а ово је могуће само у активним центрима. На основу кинетичких и кристалографских података познато је да биљне и бактеријске *GS* фосфорилују *PPT* у присуству *ATP*-а, при чему настаје *PPT-P* који се нековалентно, али иреверзибилно везује за активни центар (*Manderscheid* и *Wild*, 1986; *Logusch* и сар., 1990; *Abell* и *Villafranca*, 1991; *Logusch* и сар., 1991; *Gill* и *Eisenberg*, 2001; *Forlani* и сар., 2006). Пошто се током електрофорезе мали молекули, као што је *PPT*, уклањају из околине ензима услед различитих мобилности, промена равнотеже промовисала би досоцијацију реверзибилно везаног инхибитора, што указује да је детектована промена мобилности последица иреверзибилног везивања инхибитора за ензим. Чињеница да *GS* изоформе са максималном мобилношћу, не само да поседују значајну активност, него је у случају *GS2* та активност виша, упућује да се *PPT*

иреверзибилно везује само за неке активне центре, док остали остају слободни и активни. Вероватно постоји комуникација између активних центара са иреверзибилно везаним инхибитором и слободних активних центара на ензиму, која доводи до снижења афинитета слободних активних центара за *PPT*. Опажена активација *GS2* може се објаснити уколико активни центри са нижим афинитетом за *PPT* имају и нешто вишу каталитичку ефикасност. Комуникација између *GS* субјединица показана је за бактеријски ензим из *E. coli*, који везује *S* изомер *MSO*-а са негативном кооперативношћу, док везивање *R* изомера овог инхибитора показује позитивну кооперативност (*Rhee* и сар., 1981; *Shrake* и сар., 1982). Осим тога, експерименти са парцијално иреверзибилно инхибираним *GS* из *E. coli* са *S-MSO* показали су да са степеном инхибиције (бројем инхибираних активних центара) расте афинитет слободних активних центара за амонијум-јон, а смањује афинитет за *ATP* (*Wedler* и сар., 1982).

Уочена активација *GS2* коинцидирала је са нестанком *GS2d* изоформе, и у том смислу могуће је да везивање *PPT*-а за активне центре након фосфорилације каталисане самим ензимом, доводи до интензивирања интеракција између субјединица фаворизујући њихову асоцијацију (Слика 42). Пошто додаток *PPT*-а и *ATP*-а протеинским екстрактима хлоропласта, који су изгубили *GS2* траку након замрзавања и отапања, доводи до поновног успостављања *GS2* и губитка *GS2d* активности (Слика 43), може се закључити да ова два облика заиста постоје у одређеној равнотежи која се помера у страну *GS2* иреверзибилним везивањем *PPT*-а. Слично је показано за *GS* изоформу из мозга овце, када је апликацијом глутамата и *ATP*-а, или глутамината и *ADP*-а, односно *MSO* и *ATP*-а фаворизована асоцијација тетрамера у октамере (*Denman* и *Wedler*, 1984). Код бактеријског ензима пречишћеног из *E. coli* показано је да додаток *MSO* у присуству *ATP*-а, стабилизује кватернерну структуру ензима, повећавајући отпорност на дисоцијацију субјединица изазвану дитионитробензоевом киселином (*Maurizi* и *Ginsburg*, 1982). *Mack* и *Tischner* (1994) су предложили да је регулисана дисоцијација *GS2* октамера у тетрамере један од начина контроле стабилности и активности овог ензима током развића младих листова. Према резултатима презентованим у овом раду, иреверзибилно везивање *PPT*-а за *GS2* у присуству *ATP*-а доводи до промена у односу дисосованих субјединица и холоензима и до

повећања активности *GS2* при ниским концентрацијама *PPT*-а. Пошто у листовима биљка које су третиране *BASTA*®-ом није детектован *GS2d*, а детектоване *GS* изоформе имају повећану мобилност, може се закључити да и *in vivo* везивање *PPT*-а за активне центре у присуству интрацелуларног *ATP*-а доводи до промене односа дисосованих субјединица и *GS2* холоензима.

Иреверзибилност везивања *PPT*-а утврђена је и гел-филтрацијом ензима са иреверзибилно везаним инхибитором у три различита пуферска система (Слика 45). Пуфер 1 је коришћен како би се уклонио слободан и реверзибилно везан инхибитор, пуфер 2 како би се утврдило да ли конкуренција са супстратима може довести до досоцијације инхибитора, а пуфер 3 је коришћен јер је за бактеријски ензим показано да у киселим пуферима високе јонске силе долази до хидролизе иреверзибилно везаног *PPT-P* на *PPT* и фосфат, који напуштају активни центар (Colandruoni и Villafranca, 1986). Пошто је повећање мобилности опажено у свим узорцима након гел-филтрације може се извести закључак да је инхибитор иреверзибилно везан, и да између бактеријског ензима и *GS* из *L. corniculatus* постоје разлике у интеракцијама активног центра са инхибитором.

Ефекти *PPT*-а упоређени су са ефектима сродног инхибитора *MSO*-а у *EMSA* експерименту (Слика 44). Утицај *MSO* на активност и мобилност *GS* изоформи у *EMSA* експерименту упућује на то да се *MSO*, као и *PPT*, везује иреверзибилно у присуству *ATP*-а. За разлику од *PPT*-а, не постоји гранична вредност *MSO* концентрације након које се промене у мобилности и активности ензима не уочавају. Ово упућује да се *MSO*-а везује иреверзибилно за све активне центре на ензиму. У складу са овим је и опажено прогресивно смањење активности обе *GS* изоформе са повећањем концентрације *MSO*-а. Ниске концентрације *MSO*-а, аналогно *PPT*-у, доводе до нестанка *GS2d* и повећања *GS2* активности. Није утврђено да ли је посредни инхибиција *GS2d* или иреверзибилно везивање *MSO*-а промовише асоцијацију у *GS2*.

Сматра се да највећи део синтетисаног глутамината у младим листовима потиче од активности *GS2/GOGAT* циклуса у хлоропластима, који учествује у асимилацији NH_4^+ насталог током фотореспирације и редукције нитрата у

листовима (Wallsgrave и сар., 1987; Leegood и сар., 1995). Мутанти дувана са оверекспресијом *GS2* у мезофилним ћелијама листова имали су виши ниво *Glu* и *Gln*, снижену концентрацију NH_4^+ , и брже су расли у поређењу са *wt* биљкама, што је корелисано са повишеном *GS2* активношћу (Migge и сар., 2000). На основу ових резултата може се претпоставити да је активност *GS2* лимитирајући фактор за продукцију лисне биомасе код младих биљака. Насупрот овоме, експерименти са супресијом експресије *GS1* у нодулама *L. japonicus* (Harrison и сар., 2003) и са оверекспресијом *GS1* у корену *L. japonicus* (Limami и сар., 1999) показали су да постоји негативна корелација између *GS1* активности и продукције биомасе. Резултати и опажања приказани у овом раду такође упућују да је повећана активност *GS2*, а не *GS1*, одговорна за опажену стимулацију раста *L. corniculatus* биљка третираних ниским концентрацијама *PPT*-а. Пошто практично исти концентрациони опсег *PPT*-а доводи до стимулације производње биомасе *L. corniculatus* и до активације *GS2*, а имајући у виду значај *GS2* за продукцију биомасе, вероватно је да је стимулација производње биомасе резултат директног деловања ниских концентрација *PPT*-а на *GS2*, те да овај ефекат највероватније није последица алостеричног везивања *PPT*-а за ензим, као што су предложили Evstigneeva и сар. (2003), већ да је резултат иреверзибилног везивања *PPT*-а за активне центре ензима у присуству *ATP*-а.

На основу резултата и литературних података предложена је шема механизма (Слика 47) везивања *PPT*-а и *MSO*-а за ензим. Шема се заснива на следећим опажањима:

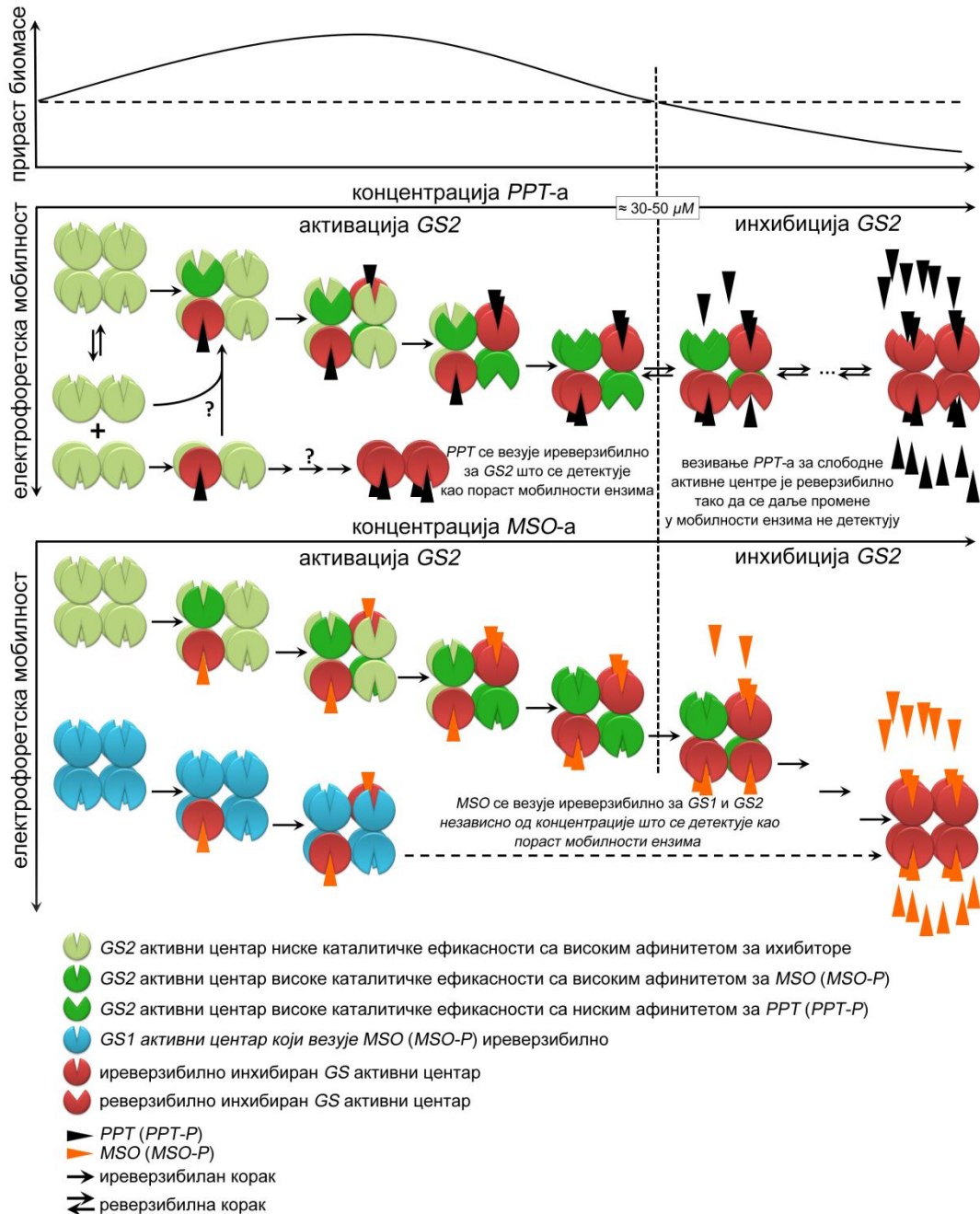
- У концентрацијама мањим од $50 \mu M$ *PPT* доводи до стимулације раста изданака *L. corniculatus*, док је у вишим концентрацијама токсичан (Слика 40).
- Везивање *PPT*-а за *GS* како *in vivo*, тако и у протеинским екстрактима доводи до пораста мобилности ензима (Слике 41А, 42А).
- Ефекти *PPT*-а на активност и мобилност *GS* изоформи испољавају се само у присуству *ATP*-а (Слика 42).

- Везивање *PPT*-а у присуству *ATP*-а је иреверзибилно при ниским концентрацијама *PPT*-а, јер инхибитор није могуће уклонити електрофорезом или гел-филтрацијом (Слика 42А, 45).
- *PPT* се у присуству *ATP*-а иреверзибилно везује за неке али не за све активне центре, јер ензими задржавају активност и при високим концентрацијама *PPT*-а у *EMSA* експерименту (Слика 42А, Б).
- Иреверзибилно везивање *PPT*-а у присуству *ATP*-а доводи до појачања интензитета *GS2* траке, а нема утицај на интензитет *GS1* траке (Слика 42А, Б).
- Када је присутан у вишим концентрацијама *PPT* се везује за слободне активне центре и инхибира ензим у потпуности (Слика 41Б). Оваква инхибиција је реверзибилна, јер се не дешава при *EMSA* експерименту (Слика 42А).
- *GS2d* је активни дериват *GS2* пошто је присутан у хлоропластној фракцији (Слика 41А) и вероватно представља *GS2* тетрамер, односно пентамер (литературни подаци).
- Додатак *PPT*-а елиминише *GS2d* активност инхибицијом (Слика 41), а вероватно и кроз промоцију реасоцијације у *GS2* у присуству *ATP*-а (Слика 43).

На шеми (Слика 47) је представљена и интеракција *MSO*-а и *GS* која се базира на следећим опажањима:

- Везивање *MSO*-а за *GS1* и *GS2* је иреверзибилно у присуству *ATP*-а у свим концентрацијама (Слика 44). Са повећањем концентрације *MSO*-а долази до инхибиције ових изоформи, а повећање мобилности не достиже плато (Слика 44А-В). Изоформе са највишом мобилношћу поседују најнижу активност.
- При ниским концентрацијама ($\leq 50 \mu M$) *MSO* стимулише, а при вишим инхибира *GS2* активност (Слика 44А, Б).
- Инхибиција *GS1* у присуству *MSO*-а је прогресивна са повећањем концентрације инхибитора (Слика 44А и Б)

- У присуству *ATP*-а *MSO* доводи до нестанка *GS2d* (Слика 44А) инхибицијом или кроз промоцију реасоцијације у *GS2*.



Слика 47: Хипотетички механизам хормезе индуковане директном стимулацијом. Шема је објављена у Dragičević и сар. (2012).

Интеракција *GS2* са *PPT*-ом: при ниским концентрацијама *PPT* се везује иререверзибилно за *GS2* активне центре доводећи до њихове инхибиције. Пошто се

ово дешава само у присуству *ATP*-а, а на основу бројних литературних података, може да се закључи да ензим фосфорилује *PPT* и да је инхибитор иреверзибилно везан за ензим у облику *PPT-P*. Ова интеракција доводи до конформационих промена суседних активних центара. Активни центри са промењеном конформацијом имају нижи афинитет за *PPT* (*PPT-P*) и вишу каталитичку ефикасност, што је основ опажене активације *GS2*. Инхибиција *GS2* активних центара је више него компензована повишеном активношћу суседних, те се као резултат опажа повећан интензитет траке *GS2* холоензима. Иреверзибилно везивање *PPT*-а индукује пораст мобилности *GS2*, услед повећања наелектрисања и промене конформације. Ниске концентрације *PPT*-а ($<5 \mu\text{M}$) доводе до нестанка *GS2d* активности инхибицијом, или кроз промоцију реасоцијације, што би такође допринело опаженој активацији *GS2*. При вишим концентрацијама *PPT*-а ($\approx 30\text{-}50 \mu\text{M}$) сви активни центри високог афинитета за инхибитор на *GS2* су засићени. Даље повећање концентрације инхибитора доводи до реверзибилне инхибиције активних центара на *GS2* који имају низак афинитет за инхибитор. Пошто *PPT* током електрофорезе дисосује од ових активних центара даље промене у електрофоретској мобилности ензима се не детектују.

Интеракција *GS1* са *PPT*-ом (није приказана): *PPT* се везује за *GS1* слично као за *GS2*, изазивајући пораст мобилности при ниским концентрацијама. Иреверзибилно везивање *PPT*-а, у присуству *ATP*-а, за одређен број активних центара на ензиму доводи до снижења афинитета суседних активних центара за инхибитор. Фосфинотрицин при вишим концентрацијама дисосује током електрофорезе од активних центара са нижим афинитетом, па се даље промене у мобилности ензима не опажају. Везивање *PPT*-а не доводи до промена у укупној активности *GS1* холоензима. Може се спекулисати да је иреверзибилна инхибиција једног *GS1* активног центра праћена еквивалентном активацијом суседних, тако да се промене укупне активности ензима не детектују.

Интеракција *GS2* са *MSO*-ом: сличан механизам као у случају *GS2-PPT* интеракције, са битном разликом у томе што се *MSO*-а иреверзибилно везује за све активне центре на ензиму. Опажена активација *GS2* вероватно је резултат

повећане каталитичке ефикасности слободних активних центара, а могућа је и реасоцијација *GS2d* у *GS2* (није приказано).

Интеракција *GS1* са *MSO*-ом: везивање је иреверзибилно и доводи до прогресивног смањења *GS1* активности и пораста мобилности услед промена у наелектрисању и конформацији *GS1-MSO* комплекса.

Представљени модел је у складу са експерименталним резултатима и литературним подацима, међутим поједини кораци захтевају проверу другим методама. Основ овог модела је комуникација између субјединица која је описана за бактеријски ензим (*Rhee* и сар., 1981; *Wedler* и сар., 1982; *Abell* и *Villafranca*, 1991; *Eisenberg* и сар., 2000), али не и за еукариотску *GS*. Модел предлаже да су *MSO* и *PPT* фосфорилувани у активном центру на основу потребе за *ATP*-ом и литературних података, али експериментални докази изнети овде не одбацују могућност да се инхибитори везују и за алостерична места. У представљеном моделу стехиометрија и топологија интеракција између различитих субјединица и активних центара са инхибиторима је арбитарна. Модел представља *GS* изоформе као октамере, што је раније било прихваћено, али све више кристалографских доказа упућује да су декамери (*Unno* и сар., 2006; *Krajewski* и сар., 2008; *Seabra* и сар., 2009). Међутим принципи предложеног модела били би подједнако применљиви и на декамере. Фосфорилација инхибитора у активним центрима, иако је предвиђена моделом није приказана на слици 47. Према овом моделу повећана активност *GS2* са иреверзибилно везиним *PPT*-ом одговорна је за опажени хорметички утицај овог хербицида на раст, што је у складу са литературним подацима који доводе повишену активност *GS2*, али не и *GS1*, у везу са продукцијом биомасе (*Limami* и сар., 1999; *Migge* и сар., 2000; *Harrison* и сар., 2003).

6. Закључци

- При тестираним условима раста *A. thaliana*, протеини кодирани *GLN1;1*, *GLN1;2* и *GLN1;3* генима улазе у састав детектованих изоформи глутамин-синтетазе. Субјединице *GLN1;1* и *GLN1;3*, као и *GLN1;2* и *GLN1;3*, а могуће и *GLN1;1* и *GLN1;2* могу да се комбинују у свим стехиометријским односима формирајући декамерне холоензиме.
- *Knockout* мутације у *GLN1;2* и *GLN1;3* генима доводе до повећане експресије *GLN1;1* гена код *A. thaliana*.
- Цитокинини и ауксини доводе до репресије *GS* и *GOGAT* гена у корену *A. thaliana* и на тај начин инхибирају примарну асимилацију амонијум-јона. Гиберелини индукују експресију *GS* и *GOGAT* гена у листовима, и имају могућу улогу у повећању капацитета за асимилацију амонијака ослобођеног током фотореспирације. Абсцисинска киселина доводи до индукције експресије одређених *GS* и *GOGAT* гена у листу и корену, што указује на њихову могућу физиолошку улогу у условима абиотичког стреса.
- Третман сублеталним концентрацијама *PPT*-а доводи до значајног повећања биомасе изданака *L. corniculatus*.
- Иреверзибилно везивање *PPT*-а, у присуству *ATP*-а, за одређен број субјединица на *GS2* ензиму из *L. corniculatus* праћено је активацијом овог ензима кроз повећање каталитичке ефикасности слободних активних центара и/или промоцију реасоцијације *GS2* субјединица.
- Повећана активност *GS2* са везаним фосфинотрицином упућује да ниске концентрације *PPT*-а индукују хормезу директном стимулацијом.

7. Литература

- Abell L. M., Villafranca J. J. (1991): Investigation of the mechanism of phosphinothricin inactivation of *Escherichia coli* glutamine synthetase using rapid quench kinetic techniques. *Biochemistry* 30: 6135-6141
- Aerts R. J., Barry T. N., McNabb W. C. (1999): Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 75: 1-12
- Almassy R. J., Janson C. A., Hamlin R., Xuong N. H., Eisenberg D. (1986): Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. *Nature* 323: 304-309
- Alonso J. M., Stepanova A. N., Leisse T. J., Kim C. J., Chen H., Shinn P., Stevenson D. K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C. C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D. E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W. L., Berry C. C., Ecker J. R. (2003): Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657
- Andrews M. (1986): The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant, Cell & Environment* 9: 511-519
- Baima S., Haegi A., Stroman P., Casadoro G. (1989): Characterization of a cDNA clone for barley leaf glutamine synthetase. *Carlsberg Research Communications* 54: 1-9
- Barratt D. H. P. (1980): Method for the detection of glutamine synthetase activity on starch gels. *Plant Science Letters* 18: 249-255
- Bayer E., Gugel K. H., Hägele K., Hagenmaier H., Jessipow S., König W. A., Zähler H. (1972): Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 98. Mitteilung.

Phosphinothricin und Phosphinothricyl-Alanyl-Alanin. *Helvetica Chimica Acta* 55: 224-239

Belz R. G., Cedergreen N., Duke S. O. (2011): Herbicide hormesis – can it be useful in crop production? *Weed Research* 51: 321-332

Bennett M. J., Cullimore J. V. (1989): Glutamine synthetase isoenzymes of *Phaseolus vulgaris* L.: subunit composition in developing root nodules and plumules. *Planta* 179: 433-440

Berendzen K., Searle I., Ravenscroft D., Koncz C., Batschauer A., Coupland G., Somssich I., Ulker B. (2005): A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Landsberg erecta. *Plant Methods* 1: 4

Berleth T., Sachs T. (2001): Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 57-62

Berlicki L. (2008): Inhibitors of glutamine synthetase and their potential application in medicine. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8: 869-878

Bernard S. M., Habash D. Z. (2009): The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist* 182: 608-620

Bernard S. M., Moller A. L., Dionisio G., Kichey T., Jahn T. P., Dubois F., Baudo M., Lopes M. S., Terce-Laforgue T., Foyer C. H., Parry M. A., Forde B. G., Araus J. L., Hirel B., Schjoerring J. K., Habash D. Z. (2008): Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Molecular Biology* 67: 89-105

Berteli F., Corrales E., Guerrero C., Ariza M. J., Pliego F., Valpuesta V. (1995): Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in the leaves of tomato. *Physiologia Plantarum* 93: 259-264

- Betti M., Arcondeguy T., Marquez A. J. (2006): Molecular analysis of two mutants from *Lotus japonicus* deficient in plastidic glutamine synthetase: functional properties of purified GLN2 enzymes. *Planta* 224: 1068-1079
- Betti M., García-Calderón M., Pérez-Delgado C. M., Credali A., Estivill G., Galván F., Vega J. M., Márquez A. J. (2012): Glutamine Synthetase in Legumes: Recent Advances in Enzyme Structure and Functional Genomics. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 7994-8024
- Block M. D., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gossele V., Movva N. R., Thompson C., Montagu M. V., Leemans J. (1987): Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *The EMBO Journal* 6: 2513-2518
- Boksha I. S., Schonfeld H. J., Langen H., Muller F., Tereshkina E. B., Burbaeva G. (2002): Glutamine synthetase isolated from human brain: octameric structure and homology of partial primary structure with human liver glutamine synthetase. *Biochemistry* 67: 1012-1020
- Bradford M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Brechlin P., Unterhalt A., Tischner R., Mäck G. (2000): Cytosolic and chloroplastic glutamine synthetase of sugarbeet (*Beta vulgaris*) respond differently to organ ontogeny and nitrogen source. *Physiologia Plantarum* 108: 263-269
- Brenner W. G., Romanov G. A., Kollmer I., Burkle L., Schmulling T. (2005): Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal* 44: 314-333
- Brian P. W. (1959): Effects of Gibberellins on Plant Growth and Development. *Biological Reviews* 34: 37-77

- Brugière N., Dubois F., Limami A. M., Lelandais M., Roux Y., Sangwan R. S., Hirel B. (1999): Glutamine Synthetase in the Phloem Plays a Major Role in Controlling Proline Production. *The Plant Cell* 11: 1995-2011
- Cai X., Wong P. P. (1989): Subunit Composition of Glutamine Synthetase Isozymes from Root Nodules of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology* 91: 1056-1062
- Calabrese E. J., Baldwin L. A. (2002): Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology* 21: 91-97
- Calabrese E. J., Baldwin L. A. (2001): The Frequency of U-Shaped Dose Responses in the Toxicological Literature. *Toxicological Sciences* 62: 330-338
- Cantón F., Suárez M.-F., José-Estanyol M., Cánovas F. (1999): Expression analysis of a cytosolic glutamine synthetase gene in cotyledons of Scots pine seedlings: developmental, light regulation and spatial distribution of specific transcripts. *Plant Molecular Biology* 40: 623-634
- Carvalho H., Sunkel C., Salema R., Cullimore J. (1997): Heteromeric assembly of the cytosolic glutamine synthetase polypeptides of *Medicago truncatula*: complementation of a *glnA* *Escherichia coli* mutant with a plant domain-swapped enzyme. *Plant Molecular Biology* 35: 623-632
- Cedergreen N. (2008): Herbicides can stimulate plant growth. *Weed Research* 48: 429-438
- Cedergreen N., Streibig J. C., Kudsk P., Mathiassen S. K., Duke S. O. (2007): The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-response* 5: 150-162
- Choi Y. A., Kim S. G., Kwon Y. M. (1999): The plastidic glutamine synthetase activity is directly modulated by means of redox change at two unique cysteine residues. *Plant Science (Amsterdam, Netherlands)* 149: 175-182

- Colanduoni J. A., Villafranca J. J. (1986): Inhibition of *Escherichia coli* glutamine synthetase by phosphinothricin. *Bioorganic Chemistry* 14: 163-169
- Coschigano K. T., Melo-Oliveira R., Lim J., Coruzzi G. M. (1998): *Arabidopsis* gls Mutants and Distinct Fd-GOGAT Genes: Implications for Photorespiration and Primary Nitrogen Assimilation. *The Plant Cell* 10: 741-752
- Cren M., Hirel B. (1999): Glutamine Synthetase in Higher Plants Regulation of Gene and Protein Expression from the Organ to the Cell. *Plant and Cell Physiology* 40: 1187-1193
- Davière J.-M., de Lucas M., Prat S. (2008): Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. *Current Opinion in Genetics & Development* 18: 295-303
- de Lucas M., Daviere J.-M., Rodriguez-Falcon M., Pontin M., Iglesias-Pedraz J. M., Lorrain S., Fankhauser C., Blazquez M. A., Titarenko E., Prat S. (2008): A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451: 480-484
- Denman R. B., Wedler F. C. (1984): Association-dissociation of mammalian brain glutamine synthetase: Effects of metal ions and other ligands. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 232: 427-440
- Devlin R. M., Karczmarczyk J., Zbiec I. (1982): Stimulation of plant growth by low concentration of napropamide. *Plant Growth Regulation* 1: 113-117
- Diaz C., Lemaitre T., Christ A., Azzopardi M., Kato Y., Sato F., Morot-Gaudry J.-F., Le Dily F., Masclaux-Daubresse C. (2008): Nitrogen Recycling and Remobilization Are Differentially Controlled by Leaf Senescence and Development Stage in *Arabidopsis* under Low Nitrogen Nutrition. *Plant Physiology* 147: 1437-1449
- Díaz P., Borsani O., Monza J. (2005) Lotus-related species and their agronomic importance, in *Lotus japonicus Handbook*. (ed A. J. Márquez), Springer Netherlands: pp 25-37

- Dragičević M., Platiša J., Nikolić N., Todorović S., Bogdanović M., Mitić N., Simonović A. (2012): Herbicide phosphinotricine causes direct stimulation hormesis *Dose Response*: 10.2203/dose-response.12-039.Simonovic
- Dragičević M., Tanacković V., Mišić D., Cvetić T., Todorović S., Bogdanović M., Simonović A. (2011): Coupling native page/activity-staining with SDS-PAGE/immunodetection for the analysis of glutamine synthetase isoforms in spinach. *Archives of biological sciences* 63 965-969
- Dubois F., Brugière N., Sangwan R., Hirel B. (1996): Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Molecular Biology* 31: 803-817
- 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. *Plant Cell* 1: 241-248
- Eisenberg D., Gill H. S., Pfluegl G. M., Rotstein S. H. (2000): Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 122-145
- Emanuelsson O., Nielsen H., von Heijne G. (1999): ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* 8: 978-984
- Ericson M. C. (1985): Purification and Properties of Glutamine Synthetase from Spinach Leaves. *Plant Physiology* 79: 923-927
- Escaray F. J., Menendez A. B., Garriz A., Pieckenstain F. L., Estrella M. J., Castagno L. N., Carrasco P., Sanjuan J., Ruiz O. A. (2012): Ecological and agronomic importance of the plant genus Lotus. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant Science (Amsterdam, Netherlands)* 182: 121-133

- Estivill G., Guardado P., Buser R., Betti M., Marquez A. J. (2010): Identification of an essential cysteinyl residue for the structure of glutamine synthetase alpha from *Phaseolus vulgaris*. *Planta* 231: 1101-1111
- Evstigneeva Z. G., Soloveva N. A., Sidelnikova L. I. (2003): Methionine Sulfoximine and Phosphinothrycin: A Review of Their Herbicidal Activity and Effects on Glutamine Synthetase. *Applied Biochemistry and Microbiology* 39: 539-543
- Feng S., Martinez C., Gusmaroli G., Wang Y., Zhou J., Wang F., Chen L., Yu L., Iglesias-Pedraz J. M., Kircher S., Schafer E., Fu X., Fan L.-M., Deng X. W. (2008): Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451: 475-479
- Finnemann J., Schjoerring J. K. (2000): Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *The Plant Journal* 24: 171-181
- Fontaine J.-X., Tercé-Laforgue T., Armengaud P., Clément G., Renou J.-P., Pelletier S., Catterou M., Azzopardi M., Gibon Y., Lea P. J., Hirel B., Dubois F. (2012): Characterization of a NADH-Dependent Glutamate Dehydrogenase Mutant of *Arabidopsis* Demonstrates the Key Role of this Enzyme in Root Carbon and Nitrogen Metabolism. *The Plant Cell* 24: 4044-4065
- Forde B. G. (2002a): Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual Review of Plant Biology* 53: 203-224
- Forde B. G. (2002b): The role of long-distance signalling in plant responses to nitrate and other nutrients. *Journal of Experimental Botany* 53: 39-43
- Forde B. G., Day H. M., Turton J. F., Wen-jun S., Cullimore J. V., Oliver J. E. (1989): Two Glutamine Synthetase Genes from *Phaseolus vulgaris* L. Display Contrasting Developmental and Spatial Patterns of Expression in Transgenic *Lotus corniculatus* Plants. *The Plant Cell* 1: 391-401

- Forde B. G., Lea P. J. (2007): Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany* 58: 2339-2358
- Forlani G., Obojska A., Berlicki Ł., Kafarski P. (2006): Phosphinothricin Analogues as Inhibitors of Plant Glutamine Synthetases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 796-802
- Franche C., Lindström K., Elmerich C. (2009): Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil* 321: 35-59
- Friml J. (2003): Auxin transport - shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 7-12
- Garcia-Dominguez M., Reyes J. C., Florencio F. J. (1999): Glutamine Synthetase Inactivation by Protein-Protein Interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 7161-7166
- Garcia-Dominguez M., Reyes J. C., Florencio F. J. (2000): NtcA represses transcription of gifA and gifB, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology* 35: 1192-1201
- Gauthier P., Lumaret R., Bedecarrats A. (1997): Chloroplast-DNA variation in the genus *Lotus* (Fabaceae) and further evidence regarding the maternal parentage of *Lotus corniculatus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 629-636
- Gazzarrini S., Lejay L., Gojon A., Ninnemann O., Frommer W. B., von Wirén N. (1999): Three Functional Transporters for Constitutive, Diurnally Regulated, and Starvation-Induced Uptake of Ammonium into Arabidopsis Roots. *The Plant Cell* 11: 937-947
- Gifford M. L., Dean A., Gutierrez R. A., Coruzzi G. M., Birnbaum K. D. (2008): Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 803-808

- Gill H. S., Eisenberg D. (2001): The crystal structure of phosphinothricin in the active site of glutamine synthetase illuminates the mechanism of enzymatic inhibition. *Biochemistry* 40: 1903-1912
- Gill H. S., Pfluegl G. M., Eisenberg D. (2002): Multicopy crystallographic refinement of a relaxed glutamine synthetase from *Mycobacterium tuberculosis* highlights flexible loops in the enzymatic mechanism and its regulation. *Biochemistry* 41: 9863-9872
- Good A. G., Shrawat A. K., Muench D. G. (2004): Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science* 9: 597-605
- Harrison J., Pou de Crescenzo M. A., Sene O., Hirel B. (2003): Does lowering glutamine synthetase activity in nodules modify nitrogen metabolism and growth of *Lotus japonicus*? *Plant Physiology* 133: 253-262
- Haymes K. (1996): Mini-prep method suitable for a plant breeding program. *Plant Molecular Biology Reporter* 14: 280-284
- He Y. X., Gui L., Liu Y. Z., Du Y., Zhou Y., Li P., Zhou C. Z. (2009): Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* glutamine synthetase Gln1 suggests a nanotube-like supramolecular assembly. *Proteins* 76: 249-254
- Hébert-Soulé D., Kikkert J. R., Reisch B. I. (1995): Phosphinothricin stimulates somatic embryogenesis in grape (*Vitis* sp. L.). *Plant Cell Reports* 14: 380-384
- Higuchi M., Pischke M. S., Mähönen A. P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M. R., Kakimoto T. (2004): In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 8821-8826
- Hirel B., Bouet C., King B., Layzell D., Jacobs F., Verma D. P. (1987): Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *The EMBO Journal* 6: 1167-1171

- Hirel B., Gadal P. (1982): Glutamine synthetase isoforms in leaves of a C4 plant: *Sorghum vulgare*. *Physiologia Plantarum* 54: 69-74
- Hirel B., Martin A., Tercé-Laforgue T., Gonzalez-Moro M.-B., Estavillo J.-M. (2005): Physiology of maize I: A comprehensive and integrated view of nitrogen metabolism in a C4 plant. *Physiologia Plantarum* 124: 167-177
- Hirel B., Weatherley C., Cretin C., Bergounioux C., Gadal P. (1984): Multiple Subunit Composition of Chloroplastic Glutamine Synthetase of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology* 74: 448-450
- Ho C.-H., Lin S.-H., Hu H.-C., Tsay Y.-F. (2009): CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell* 138: 1184-1194
- Hoerlein G. (1994): Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology* 138: 73-145
- Hoshino Y., Mii M. (1998): Bialaphos stimulates shoot regeneration from hairy roots of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* 17: 256-261
- Ireland R. J., Lea P. J. (1999) The enzymes of Glutamine, Glutamate, Asparagine and Aspartate Metabolism, in *Plant Amino Acids Biochemistry and Biotechnology*. (ed K. Singh Bijay) New York: Marcel Dekker, Inc.: pp 49-111
- Ishiyama K., Inoue E., Tabuchi M., Yamaya T., Takahashi H. (2004a): Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. *Plant and Cell Physiology* 45: 1640-1647
- Ishiyama K., Inoue E., Watanabe-Takahashi A., Obara M., Yamaya T., Takahashi H. (2004b): Kinetic Properties and Ammonium-dependent Regulation of Cytosolic Isoenzymes of Glutamine Synthetase in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 279: 16598-16605

- Ishiyama K., Inoue E., Yamaya T., Takahashi H. (2006): Gln49 and Ser174 residues play critical roles in determining the catalytic efficiencies of plant glutamine synthetase. *Plant and Cell Physiology* 47: 299-303
- Itoh H., Matsuoka M., Steber C. M. (2003): A role for the ubiquitin-26S-proteasome pathway in gibberellin signaling. *Trends in Plant Science* 8: 492-497
- Jiang Y., Yang B., Harris N. S., Deyholos M. K. (2007): Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany* 58: 3591-3607
- Kaiser J. (2003): Sipping From a Poisoned Chalice. *Science* 302: 376-379
- Kamiya Y., Garcia-Martinez J. L. (1999): Regulation of gibberellin biosynthesis by light. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 398-403
- Kamo K., van Eck J. (1997): Effect of bialaphos and phosphinothricin on plant regeneration from long- and short-term callus cultures of *Gladiolus*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 33: 180-183
- Kasahara H., Hanada A., Kuzuyama T., Takagi M., Kamiya Y., Yamaguchi S. (2002): Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 47: 45188-45194
- Keys A. J., Bird I. F., Cornelius M. J., Lea P. J., Wallsgrave R. M., Miflin B. J. (1978): Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* 275: 741-743
- Kiba T., Kudo T., Kojima M., Sakakibara H. (2011): Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *Journal of Experimental Botany* 62: 1399-1409
- Knight T. J., Langston-Unkefer P. J. (1988): Adenine nucleotides as allosteric effectors of pea seed glutamine synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 263: 11084-11089

- Krajewski W. W., Collins R., Holmberg-Schiavone L., Jones T. A., Karlberg T., Mowbray S. L. (2008): Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design. *Journal of Molecular Biology* 375: 217-228
- Krajewski W. W., Jones T. A., Mowbray S. L. (2005): Structure of Mycobacterium tuberculosis glutamine synthetase in complex with a transition-state mimic provides functional insights. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 10499-10504
- Krishnaswamy P. R., Pamiljans V., Meister A. (1960): Activated Glutamate Intermediate in the Enzymatic Synthesis of Glutamine *Journal of Biological Chemistry* 235: 39-40
- Krouk G., Lacombe B., Bielach A., Perrine-Walker F., Malinska K., Mounier E., Hoyerova K., Tillard P., Leon S., Ljung K., Zazimalova E., Benkova E., Nacry P., Gojon A. (2010): Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell* 18: 927-937
- Kuiper D. (1988): Growth Responses of *Plantago major* L. ssp. pleiosperma (Pilger) to Changes in Mineral Supply : Evidence for Regulation by Cytokinins. *Plant Physiology* 87: 555-557
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lam H.-M., Coschigano K. T., Oliveira I. C., Melo-Oliveira R., Coruzzi G. M. (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
- Lancien M., Gadal P., Hodges M. (2000): Enzyme Redundancy and the Importance of 2-Oxoglutarate in Higher Plant Ammonium Assimilation. *Plant Physiology* 123: 817-824

- Lancien M., Martin M., Hsieh M. H., Leustek T., Goodman H., Coruzzi G. M. (2002): Arabidopsis *glt1-T* mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. *The Plant Journal* 29: 347-358
- Lea P. J., Azevedo R. A. (2006): Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Annals of Applied Biology* 149: 243-247
- Lea P. J., Mifflin B. J. (1974): Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 251: 614-616
- Leegood R. C., Lea P. J., Adcock M. D., Häusler R. E. (1995): The regulation and control of photorespiration. *Journal of Experimental Botany* 46: 1397-1414
- Lemaitre T., Gaufichon L., Boutet-Mercey S., Christ A., Masclaux-Daubresse C. (2008): Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. *Plant Cell Physiol* 49: 1056-1065
- Li R. J., Hua W., Lu Y. T. (2006): Arabidopsis cytosolic glutamine synthetase AtGLN1;1 is a potential substrate of AtCRK3 involved in leaf senescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342: 119-126
- Liaw S. H., Eisenberg D. (1994): Structural model for the reaction mechanism of glutamine synthetase, based on five crystal structures of enzyme-substrate complexes. *Biochemistry* 33: 675-681
- Liaw S. H., Pan C., Eisenberg D. (1993): Feedback inhibition of fully unadenylylated glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium* by glycine, alanine, and serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 4996-5000
- Lima L., Seabra A., Melo P., Cullimore J., Carvalho H. (2006a): Phosphorylation and subsequent interaction with 14-3-3 proteins regulate plastid glutamine synthetase in *Medicago truncatula*. *Planta* 223: 558-567

- Lima L., Seabra A., Melo P., Cullimore J., Carvalho H. (2006b): Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase of *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* 57: 2751-2761
- Limami A., Phillipson B., Ameziane R., Pernollet N., Jiang Q., Roy R., Deleens E., Chaumont-Bonnet M., Gresshoff P. M., Hirel B. (1999): Does root glutamine synthetase control plant biomass production in lotus japonicus L.? *Planta* 209: 495-502
- Lindahl M., Kieselbach T. (2009): Disulphide proteomes and interactions with thioredoxin on the track towards understanding redox regulation in chloroplasts and cyanobacteria. *Journal of Proteomics* 72: 416-438
- Llorca O., Betti M., González J. M., Valencia A., Márquez A. J., Valpuesta J. M. (2006): The three-dimensional structure of an eukaryotic glutamine synthetase: Functional implications of its oligomeric structure. *Journal of Structural Biology* 156: 469-479
- Logusch E. W., Walker D. M., McDonald J. F., Franz J. E. (1991): Inhibition of Plant Glutamine Synthetases by Substituted Phosphinothricins. *Plant Physiology* 95: 1057-1062
- Logusch E. W., Walker D. M., McDonald J. F., Franz J. E., Villafranca J. J., DiIanni C. L., Colanduoni J. A., Li B., Schineller J. B. (1990): Inhibition of Escherichia coli glutamine synthetase by .alpha.- and .gamma.-substituted phosphinothricins. *Biochemistry* 29: 366-372
- López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Herrera-Estrella L. (2003): The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 280-287
- Lothier J., Gaufichon L., Sormani R., Lemaître T., Azzopardi M., Morin H., Chardon F., Reisdorf-Cren M., Avicé J.-C., Masclaux-Daubresse C. (2011): The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and

- ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting. *Journal of Experimental Botany* 62: 1375-1390
- Lutts S., Majerus V., Kinet J. M. (1999): NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum* 105: 450-458
- Mäck G. (1995): Organ-specific changes in the activity and subunit composition of glutamine-synthetase isoforms of barley (*Hordeum vulgare* L.) after growth on different levels of NH₄⁺. *Planta* 196: 231-238
- Mack G. (1998): Glutamine synthetase isoenzymes, oligomers and subunits from hairy roots of *Beta vulgaris* L. var. *lutea*. *Planta* 205: 113-120
- Mäck G., Tischner R. (1994): Activity of the tetramer and octamer of glutamine synthetase isoforms during primary leaf ontogeny of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* 194: 353-359
- Manderscheid R., Wild A. (1986): Studies on the Mechanism of Inhibition by Phosphinothricin of Glutamine Synthetase Isolated from *Triticum aestivum* L. *Journal of Plant Physiology* 123: 135-142
- Martin A., Belastegui-Macadam X., Quillere I., Floriot M., Valadier M. H., Pommel B., Andrieu B., Donnison I., Hirel B. (2005): Nitrogen management and senescence in two maize hybrids differing in the persistence of leaf greenness: agronomic, physiological and molecular aspects. *New Phytologist* 167: 483-492
- Martin A., Lee J., Kichey T., Gerentes D., Zivy M., Tatout C., Dubois F., Balliau T., Valot B., Davanture M., Tercé-Laforgue T., Quilleré I., Coque M., Gallais A., Gonzalez-Moro M.-B., Bethencourt L., Habash D. Z., Lea P. J., Charcosset A., Perez P., Murigneux A., Sakakibara H., Edwards K. J., Hirel B. (2006): Two Cytosolic Glutamine Synthetase Isoforms of Maize Are Specifically Involved in the Control of Grain Production. *The Plant Cell* 18: 3252-3274
- Masclaux C., Valadier M. H., Brugiere N., Morot-Gaudry J. F., Hirel B. (2000): Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

- shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 211: 510-518
- Maurizi M. R., Ginsburg A. (1982): Active site ligand stabilization of quaternary structures of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 257: 7246-7251
- McElver J., Tzafrir I., Aux G., Rogers R., Ashby C., Smith K., Thomas C., Schetter A., Zhou Q., Cushman M. A., Tossberg J., Nickle T., Levin J. Z., Law M., Meinke D., Patton D. (2001): Insertional mutagenesis of genes required for seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 159: 1751-1763
- McParland R. H., Guevara J. G., Becker R. R., Evans H. J. (1976): The purification and properties of the glutamine synthetase from the cytosol of Soya-bean root nodules. *Biochemical Journal* 153: 597-606
- Meek T. D., Villafranca J. J. (1980): Kinetic mechanism of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *Biochemistry* 19: 5513-5519
- Melo-Oliveira R., Oliveira I. C., Coruzzi G. M. (1996): *Arabidopsis* mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 4718-4723
- Melo P. M., Silva L. S., Ribeiro I., Seabra A. R., Carvalho H. G. (2011): Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated by tyrosine nitration. *Plant Physiology* 157: 1505–1517
- Migge A., Carrayol E., Hirel B., Becker T. W. (2000): Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta* 210: 252-260
- Migge A., Carrayol E., Hirel B., Lohmann M., Meya G., Becker T. W. (1998): Regulation of the subunit composition of plastidic glutamine synthetase of the

- wild-type and of the phytochrome-deficient aurea mutant of tomato by blue/UV-A- or by UV-B-light. *Plant Molecular Biology* 37: 689-700
- Migge A., Meya G., Carrayol E., Hirel B., Becker T. (1996): Regulation of the subunit composition of tomato plastidic glutamine synthetase by light and the nitrogen source. *Planta* 200: 213-220
- Mijatović M., Milijić S., Spasić M., Petrović R., Mitrović S. (1986): Morphology, biology and productivity in new cultivars of bird's-foot trefoil Zora and Bokor. *Arhiv za poljoprivredne nauke* 47: 149-155
- Miranda-Ham M. L., Loyola-Vargas V. M. (1992): Purification and characterization of glutamine synthetase from leaves of *Catharanthus roseus* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 30: 585-592
- Mok D. W., Mok M. C. (2001): Cytokinin Metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 89-118
- Motohashi K., Kondoh A., Stumpp M. T., Hisabori T. (2001): Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 11224-11229
- Mruk D. D., Cheng C. Y. (2011): Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis* 1: 121-122
- Murashige T., Skoog F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Nazoa P., Vidmar J. J., Tranbarger T. J., Mouline K., Damiani I., Tillard P., Zhuo D., Glass A. D., Touraine B. (2003): Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Molecular Biology* 52: 689-703

- Nikolić R., Mitić N., Nešković M. (1997): Evaluation of agronomic traits in tissue culture – derived progeny of bird's-foot trefoil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48: 67-69
- Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., Ueguchi C. (2004): Histidine Kinase Homologs That Act as Cytokinin Receptors Possess Overlapping Functions in the Regulation of Shoot and Root Growth in Arabidopsis. *The Plant Cell* 16: 1365-1377
- Nye P. H., Tinker P. B. (1977): Solute Movement in the Soil-Root System, Berkeley: University of California Press: pp 33
- Ochs G., Schock G., Wild A. (1993): Chloroplastic glutamine synthetase from *Brassica napus*. *Plant Physiology* 103: 303-304
- Oh E., Yamaguchi S., Kamiya Y., Bae G., Chung W.-I., Choi G. (2006): Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. *The Plant Journal* 47: 124-139
- Oliveira I. C., Brears T., Knight T. J., Clark A., Coruzzi G. M. (2002): Overexpression of Cytosolic Glutamine Synthetase. Relation to Nitrogen, Light, and Photorespiration. *Plant Physiology* 129: 1170-1180
- Oliveira I. C., Brenner E., Chiu J., Hsieh M.-H., Kouranov A., Lam H.-M., Shin M. J., Coruzzi G. (2001): Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34: 567-575
- Oliveira I. C., Coruzzi G. M. (1999): Carbon and Amino Acids Reciprocally Modulate the Expression of Glutamine Synthetase in Arabidopsis. *Plant Physiology* 121: 301-310
- Orea A., Pajuelo P., Pajuelo E., Quidiello C., Romero J. M., Marquez A. J. (2002): Isolation of photorespiratory mutants from *Lotus japonicus* deficient in glutamine synthetase. *Physiologia Plantarum* 115: 352-361

- Ortega J. L., Roche D., Sengupta-Gopalan C. (1999): Oxidative Turnover of Soybean Root Glutamine Synthetase. In Vitro and in Vivo Studies. *Plant Physiology* 119: 1483-1496
- Pace J., McDermott E. E. (1952): Methionine Sulphoximine and some Enzyme Systems involving Glutamine. *Nature* 169: 415-416
- Pushkin A. V., Antoniuk L. P., Solovieva N. A., Shubin V. V., Evstigneeva Z. G., Kretovich W. L., Cherednikova T. V., Tsuprun V. L., Zograf O. N., Kiselev N. A. (1985): Glutamine synthetase of leaf and seed cytosol. Structure and properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 828: 336-350
- Radak Z., Chung H. Y., Koltai E., Taylor A. W., Goto S. (2008): Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Research Reviews* 7: 34-42
- Rawat S. R., Silim S. N., Kronzucker H. J., Siddiqi M. Y., Glass A. D. (1999): AtAMT1 gene expression and NH₄⁺ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *The Plant Journal* 19: 143-152
- Ray T. B. (1984): Site of Action of Chlorsulfuron: inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiology* 75: 827-831
- Reed R. C., Brady S. R., Muday G. K. (1998): Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 118: 1369-1378
- Rhee S. G., Chock P. B., Wedler F. C., Sugiyama Y. (1981): Subunit interaction in unadenylylated glutamine synthetase from *Escherichia coli*. Evidence from methionine sulfoximine inhibition studies. *The Journal of Biological Chemistry* 256: 644-648
- Richardson B. J., Baverstock P. R., Adams M. (1988): Allozyme Electrophoresis: A Handbook for Animal Systematics and Population Studies, Waltham: Academic Press pp 24-26

- Robinson D. (1994): The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytologist* 127: 635-674
- Roche D., Temple S., Sengupta-Gopalan C. (1993): Two classes of differentially regulated glutamine synthetase genes are expressed in the soybean nodule: a nodule-specific class and a constitutively expressed class. *Plant Molecular Biology* 22: 971-983
- Ronzio R. A., Meister A. (1968): Phosphorylation of methionine sulfoximine by glutamine synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 59: 164-170
- Ronzio R. A., Rowe W. B., Meister A. (1969): Mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. *Biochemistry* 8: 1066-1075
- Rowe W. B., Ronzio R. A., Meister A. (1969): Inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. Studies on methionine sulfoximine phosphate. *Biochemistry* 8: 2674-2680
- Sakakibara H., Shimizu H., Hase T., Yamazaki Y., Takao T., Shimonishi Y., Sugiyama T. (1996): Molecular identification and characterization of cytosolic isoforms of glutamine synthetase in maize roots. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 29561-29568
- Sakakibara H., Takei K., Hirose N. (2006): Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends in Plant Science* 11: 440-448
- Sakamoto A., Takeba G., Shibata D., Tanaka K. (1990): Phytochrome-mediated activation of the gene for cytosolic glutamine-synthetase (GS1) during imbibition of photosensitive lettuce seeds. *Plant Molecular Biology* 15: 317-323
- Sambrook J. J., Green M. R. (2012): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th edn, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: pp 5

- Samuelson M. E., Larsson C.-M. (1993): Nitrate regulation of zeation riboside levels in barley roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium. *Plant Science (Amsterdam, Netherlands)* 93: 77-84
- Santos C., Pereira A., Pereira S., Teixeira J. (2004): Regulation of glutamine synthetase expression in sunflower cells exposed to salt and osmotic stress. *Scientia Horticulturae* 103: 101-111
- Savić J., Platiša J., Dragičević M., Nikolić R., Mitić N., Cingel A., Vinterhalter B. (2010): The activity of peroxidases and superoxide dismutases in transgenic phosphinothricin-resistant *Lotus corniculatus* shoots. *Archives of biological sciences* 62: 1063-1070
- Sawada Y., Katsumata T., Kitamura J., Kawaide H., Nakajima M., Asami T., Nakaminami K., Kurahashi T., Mitsuhashi W., Inoue Y., Toyomasu T. (2008): Germination of photoblastic lettuce seeds is regulated via the control of endogenous physiologically active gibberellin content, rather than of gibberellin responsiveness. *Journal of Experimental Botany* 59: 3383-3393
- Scheer J. M., Ryan C. A. (2001): A method for the quantitative recovery of proteins from polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 298: 130-132
- Scheible W.-R., Lauerer M., Schulze E.-D., Caboche M., Stitt M. (1997): Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *The Plant Journal* 11: 671-691
- Schmid M., Davison T. S., Henz S. R., Pape U. J., Demar M., Vingron M., Scholkopf B., Weigel D., Lohmann J. U. (2005): A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics* 37: 501-506
- Seabra A. R., Carvalho H., Pereira P. J. (2009): Crystallization and preliminary crystallographic characterization of glutamine synthetase from *Medicago truncatula*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 65: 1309-1312

- Seo M., Koshiha T. (2002): Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 7: 41-48
- Sessions A., Burke E., Presting G., Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C., Clarke J. D., Cotton D., Bullis D., Snell J., Miguel T., Hutchison D., Kimmerly B., Mitzel T., Katagiri F., Glazebrook J., Law M., Goff S. A. (2002): A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *The Plant Cell* 14: 2985-2994
- Shkolnik-Inbar D., Bar-Zvi D. (2010): ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 22: 3560-3573
- Shrake A., Ginsburg A., Wedler F., Sugiyama Y. (1982): On the binding of L-S- and L-R-dia stereoisomers of the substrate analog L-methionine sulfoximine to glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 257: 8238-8243
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T. J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Soding J., Thompson J. D., Higgins D. G. (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7: 539
- Signora L., De Smet I., Foyer C. H., Zhang H. (2001): ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 28: 655-662
- Simonovic A. D., Anderson M. D. (2007): Analysis of methionine oxides and nitrogen-transporting amino acids in chilled and acclimated maize seedlings. *Amino Acids* 33: 607-613
- Simonović A. (2011): Biotehnologija i genetičko inženjerstvo biljaka, Beograd: NNK Internacional: pp 149-157

- Simonović A. D., Anderson M. D. (2007): Effect of chilling and acclimation on the activity of glutamine synthetase isoforms in maize seedlings. *Archives of biological sciences* 57: 177-185
- Simonović A. D., Gaddameedhi S., Anderson M. D. (2004): In-gel precipitation of enzymatically released phosphate. *Analytical Biochemistry* 334: 312-317
- Singh S., Letham D. S., Zhang X.-d., Palni L. M. S. (1992): Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VI. Effect of nitrogenous nutrients on cytokinin levels and senescence of tobacco leaves. *Physiologia Plantarum* 84: 262-268
- Smith A. E. (1988): Persistence and transformation of the herbicide [14C] glufosinate-ammonium in prairie soils under laboratory conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 393-397
- Smith P. M., Atkins C. A. (2002): Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 128: 793-802
- Somerville C. R., Ogren W. L. (1980): Inhibition of photosynthesis in Arabidopsis mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature* 286: 257-259
- Stadtman E. R. (1990): Discovery of glutamine synthetase cascade. *Methods in Enzymology* 182: 793-809
- Steiner J. J., de los Santos G. G. (2001): Adaptive Ecology of *Lotus corniculatus* L. Genotypes. *Crop Science* 41: 552-563
- Steiner S., Schroter Y., Pfalz J., Pfannschmidt T. (2011): Identification of essential subunits in the plastid-encoded RNA polymerase complex reveals building blocks for proper plastid development. *Plant Physiology* 157: 1043-1055
- Steinrücken H. C., Amrhein N. (1980): The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94: 1207-1212

- Stewart G. R., Rhodes D. (1977): A comparison of the characteristics of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase from *Lemna minor* L. *New Phytologist* 79: 257-268
- Tachibana K., Watanabe T., Sekizawa Y., Takematsu T. (1986a): Accumulation of Ammonia in Plants Treated with Bialaphos. *Journal of Pesticide Science* 11: 33-37
- Tachibana K., Watanabe T., Sekizawa Y., Takematsu T. (1986b): Inhibition of Glutamine Synthetase and Quantitative Changes of Free Amino Acids in Shoots of Bialaphostreated Japanese Barnyard Millet. *Journal of Pesticide Science* 11: 27-31
- Taira M., Valtersson U., Burkhardt B., Ludwig R. A. (2004): Arabidopsis thaliana GLN2-Encoded Glutamine Synthetase Is Dual Targeted to Leaf Mitochondria and Chloroplasts. *The Plant Cell* 16: 2048-2058
- Takei K., Sakakibara H., Taniguchi M., Sugiyama T. (2001): Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology* 42: 85-93
- Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* 45: 1053-1062
- Teixeira J., Pereira S., Cánovas F., Salema R. (2005): Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) plants: cell- and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. *Journal of Experimental Botany* 56: 663-671
- Temple S. J., Kunjibettu S., Roche D., Sengupta-Gopalan C. (1996): Total Glutamine Synthetase Activity during Soybean Nodule Development Is Controlled at the Level of Transcription and Holoprotein Turnover. *Plant Physiology* 112: 1723-1733

- TheArabidopsisGenomeInitiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Tholey G., Bloch S., Ledig M., Mandel P., Wedler F. (1987): Chick brain glutamine synthetase and Mn^{2+} - Mg^{2+} interactions. *Neurochemical Research* 12: 1041-1047
- Thompson C. J., Movva N. R., Tizard R., Cramer R., Davies J. E., Lauwereys M., Botterman J. (1987): Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal* 6: 2519-2523
- Toyomasu T., Kawaide H., Mitsunashi W., Inoue Y., Kamiya Y. (1998): Phytochrome Regulates Gibberellin Biosynthesis during Germination of Photoblastic Lettuce Seeds. *Plant Physiology* 118: 1517-1523
- Tuteja N. (2007): Abscisic Acid and abiotic stress signaling. *Plant Signaling & Behavior* 2: 135-138
- Unno H., Uchida T., Sugawara H., Kurisu G., Sugiyama T., Yamaya T., Sakakibara H., Hase T., Kusunoki M. (2006): Atomic Structure of Plant Glutamine Synthetase. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 29287-29296
- van Rooyen J. M., Abratt V. R., Belrhali H., Sewell T. (2011): Crystal structure of Type III glutamine synthetase: surprising reversal of the inter-ring interface. *Structure* 19: 471-483
- Velini E. D., Trindade M. L. B., Barberis L. R. M., Duke S. O. (2010): Growth Regulation and Other Secondary Effects of Herbicides. *Weed Science* 58: 351-354
- Vidal E. A., Araus V., Lu C., Parry G., Green P. J., Coruzzi G. M., Gutierrez R. A. (2010): Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 4477-4482

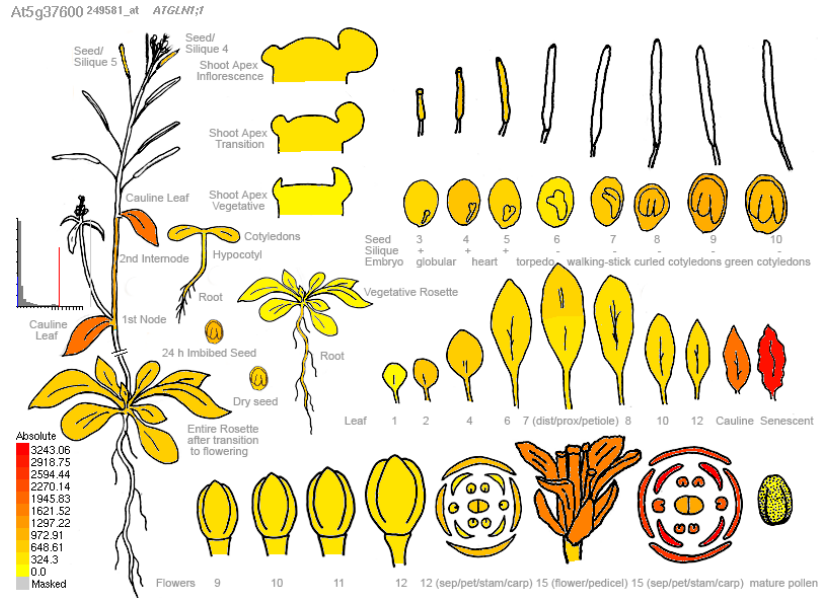
- Walch-Liu P., Filleur S., Gan Y., Forde B. G. (2005a): Signaling mechanisms integrating root and shoot responses to changes in the nitrogen supply. *Photosynthesis Research* 83: 239-250
- Walch-Liu P., Ivanov, II, Filleur S., Gan Y., Remans T., Forde B. G. (2005b): Nitrogen regulation of root branching. *Annals of Botany* 97: 875-881
- Walker E. L., Coruzzi G. M. (1989): Developmentally Regulated Expression of the Gene Family for Cytosolic Glutamine Synthetase in *Pisum sativum*. *Plant Physiology* 91: 702-708
- Wall L. G. (2000): The Actinorhizal Symbiosis. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 167-182
- Wallsgrave R. M., Turner J. C., Hall N. P., Kendall A. C., Bright S. W. (1987): Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase-biochemical and genetic analysis. *Plant Physiology* 83: 155-158
- Wang R., Guegler K., LaBrie S. T., Crawford N. M. (2000): Genomic Analysis of a Nutrient Response in *Arabidopsis* Reveals Diverse Expression Patterns and Novel Metabolic and Potential Regulatory Genes Induced by Nitrate. *The Plant Cell* 12: 1491-1509
- Wang R., Okamoto M., Xing X., Crawford N. M. (2003): Microarray Analysis of the Nitrate Response in *Arabidopsis* Roots and Shoots Reveals over 1,000 Rapidly Responding Genes and New Linkages to Glucose, Trehalose-6-Phosphate, Iron, and Sulfate Metabolism. *Plant Physiology* 132: 556-567
- Wang R., Xing X., Wang Y., Tran A., Crawford N. M. (2009): A Genetic Screen for Nitrate Regulatory Mutants Captures the Nitrate Transporter Gene NRT1.1. *Plant Physiology* 151: 472-478
- Wang Z.-Q., Yuan Y.-Z., Ou J.-Q., Lin Q.-H., Zhang C.-F. (2007): Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline

- accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *Journal of Plant Physiology* 164: 695-701
- Waterhouse A. M., Procter J. B., Martin D. M. A., Clamp M., Barton G. J. (2009): Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189-1191
- Wedler F. C., Sugiyama Y., Fisher K. E. (1982): Catalytic cooperativity and subunit interactions in *E. coli* glutamine synthetase binding and kinetics with methionine sulfoximine and related inhibitors. *Biochemistry* 21: 2168-2177
- Wendler C., Barniske M., Wild A. (1990): Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and photorespiration of C3 and C4 plants. *Photosynthesis Research* 24: 55-61
- White J., Chang S. Y., Bibb M. J. (1990): A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 18
- Wiedman S. J., Appleby A. P. (1972): Plant growth stimulation by sublethal concentrations of herbicides. *Weed Research* 12: 65-74
- Wilkinson S., Davies W. J. (2002): ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell & Environment* 25: 195-210
- Williams L. E., Miller A. J. (2001): Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 659-688
- Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G. V., Provart N. J. (2007): An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS One* 2: e718
- Wohlleben W., Arnold W., Broer I., Hillemann D., Strauch E., Puhler A. (1988): Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from

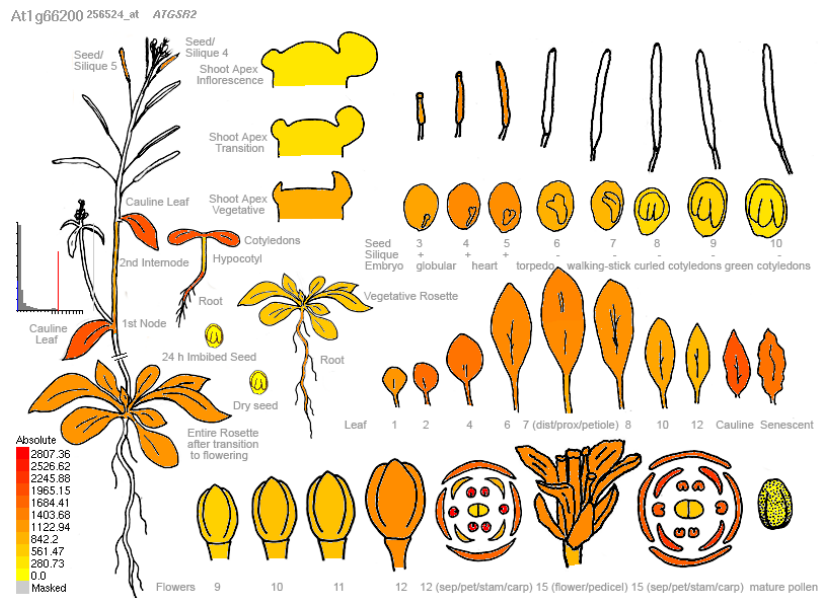
- Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25-37
- Woolfolk C. A., Shapiro B., Stadtman E. R. (1966): Regulation of glutamine synthetase: I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 116: 177-192
- Woolfolk C. A., Stadtman E. R. (1967): Regulation of glutamine synthetase. 3. Cumulative feedback inhibition of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 118: 736-755
- Yamaguchi S. (2008): Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology* 59: 225-251
- Yamaguchi S., Smith M. W., Brown R. G. S., Kamiya Y., Sun T.-p. (1998): Phytochrome Regulation and Differential Expression of Gibberellin 3 β -Hydroxylase Genes in Germinating *Arabidopsis* Seeds. *The Plant Cell* 10: 2115-2126
- Yamazaki D., Motohashi K., Kasama T., Hara Y., Hisabori T. (2004): Target Proteins of the Cytosolic Thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 45: 18-27
- Yan S., Tang Z., Su W., Sun W. (2005): Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics* 5: 235-244
- Yoshida Y., Kiyosue T., Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1997): Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiology* 38: 1095-1102
- Zhang H., Jennings A., Barlow P. W., Forde B. G. (1999): Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 6529-6534

8. Прилози

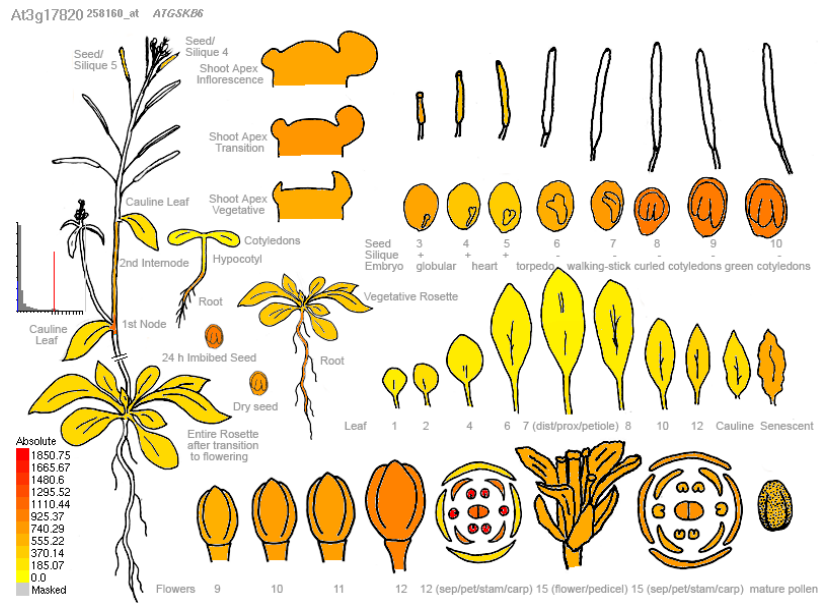
8.1 Прилог 1: Мапе експресије *GS* и *GOGAT* гена *A. thaliana*



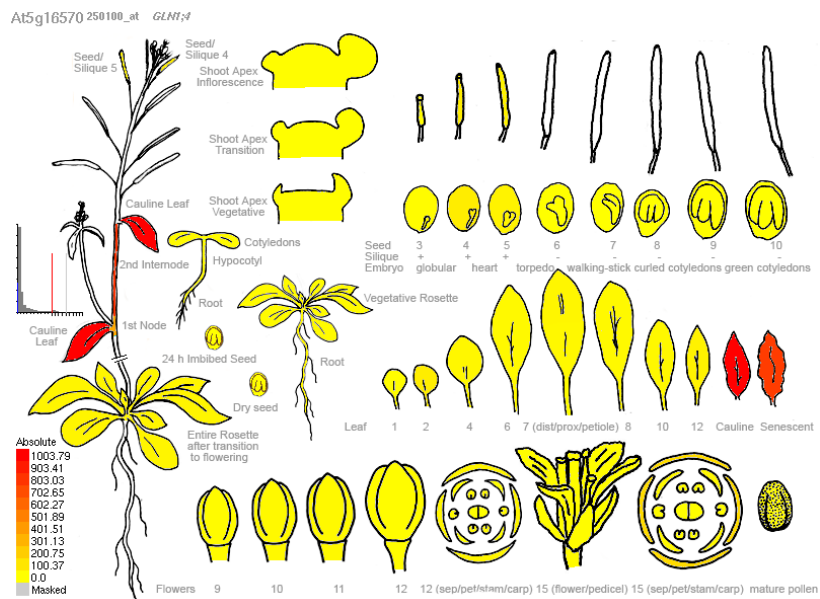
Мапа експресије *GLN1;1* гена у различитим фазама развића *A. thaliana*.



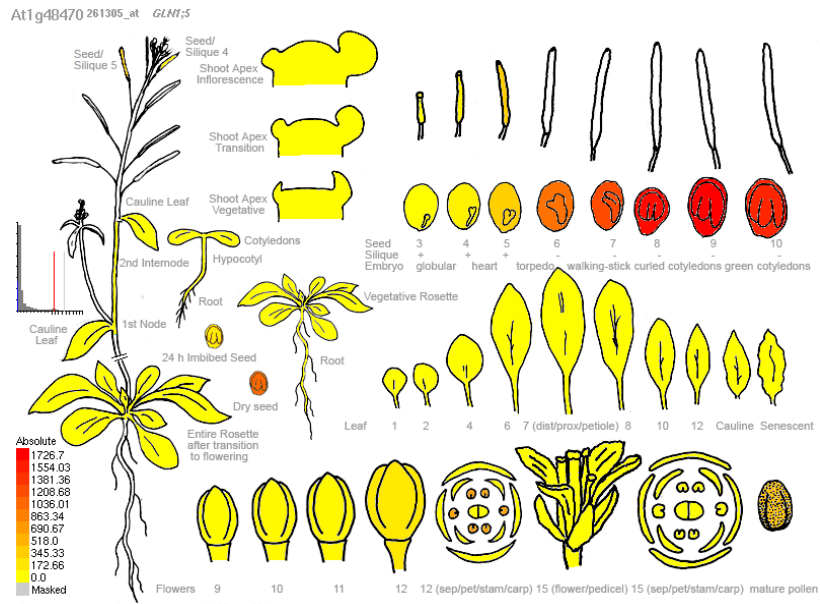
Мапа експресије *GLN1;2* гена у различитим фазама развића *A. thaliana*.



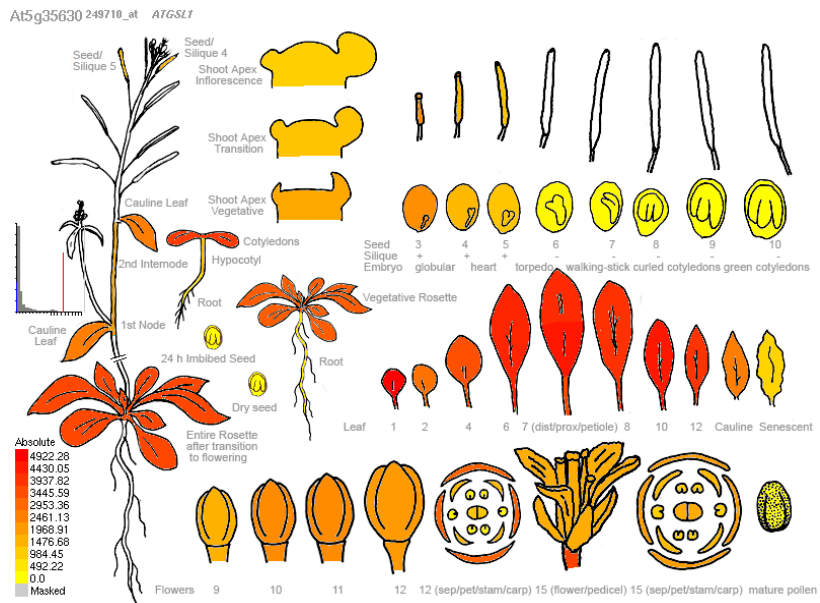
Мапа експресије *GLN1*;3 гена у различитим фазама развића *A. thaliana*.



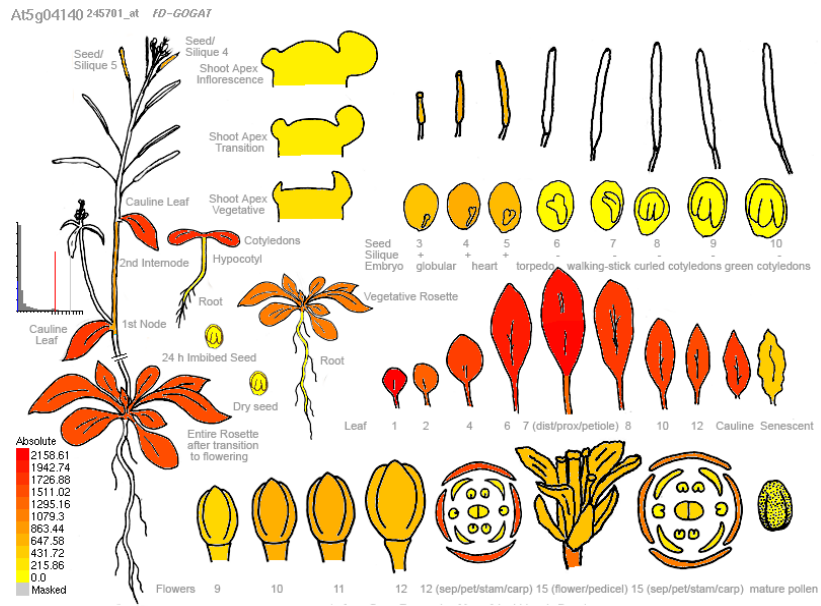
Мапа експресије *GLN1*;4 гена у различитим фазама развића *A. thaliana*.



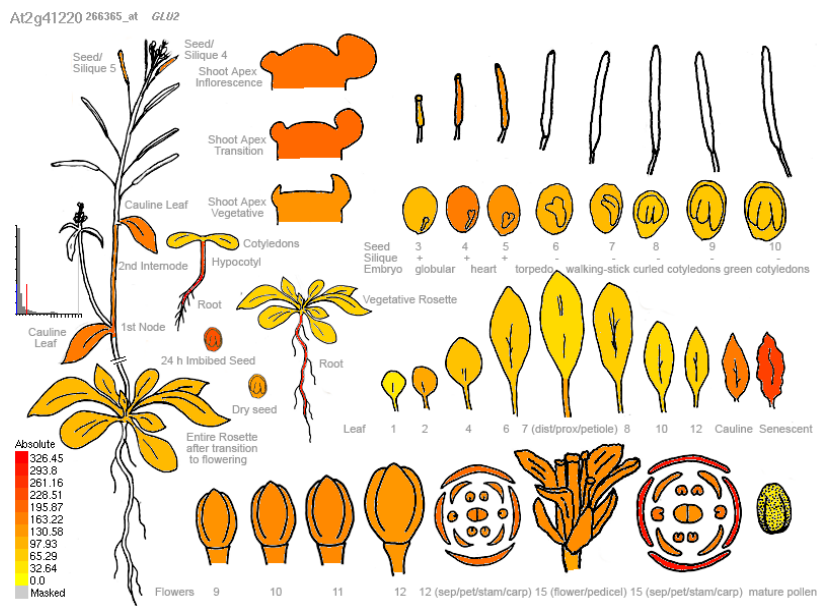
Мапа експресије *GLN1;5* гена у различитим фазама развића *A. thaliana*.



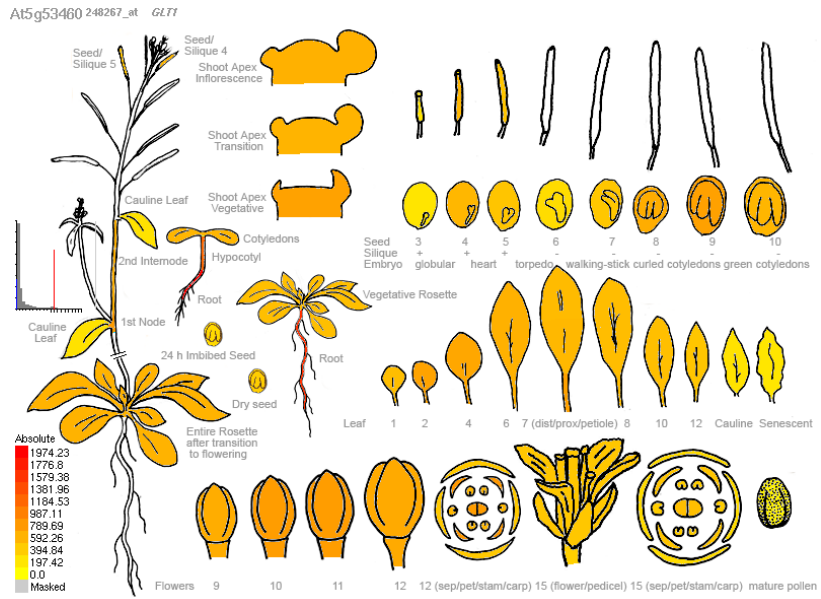
Мапа експресије *GLN2* гена у различитим фазама развића *A. thaliana*.



Мапа екресције *GLU1* гена у различитим фазама развића *A. thaliana*.



Мапа екресције *GLU2* гена у различитим фазама развића *A. thaliana*.



Мапа експресије *GLT1* гена у различитим фазама развића *A. thaliana*.

Мапе експресије су конструсане коришћењем података из *Schmid* и сар. (2005).

8.2 Прилог 2: Листа скраћеница са речником

1;1*ko* - *knockout* мутант *A. thaliana* у *GLN1;1* гену.

1;2*ko* - *knockout* мутант *A. thaliana* у *GLN1;2* гену.

1;3*ko* - *knockout* мутант *A. thaliana* у *GLN1;3* гену.

1;4*ko* - *knockout* мутант *A. thaliana* у *GLN1;4* гену.

1;5*ko* - *knockout* мутант *A. thaliana* у *GLN1;5* гену.

2,4-*D* - 2,4 дихлорфеноксиацетат, синтетички ауксин.

3'-*utr* - нетранслирани регион на 3' страни информационе РНК који садржи регулаторне секвенце повезане са полиаденилацијом, ефикасношћу translације и стабилности РНК.

5'-*utr* - нетранслирани регион на 5' страни информационе РНК пре старт коднона, који садржи везивно место за рибозом и друге регулаторне секвенце.

AAT - аспартат-аминотрансфераза (*EC* 2.6.1.1), ензим који каталише реверзибилни пренос аминокиселине између глутамата и аспартата.

ABA - абсцисинска киселина.

ADP - аденозин дифосфат.

AMP - аденозин монофосфат.

ANOVA - анализа варијансе, статистичка метода за поређење више група података.

AS - аспарагин-синтетаза (*EC* 6.3.5.4), ензим који каталише синтезу аспарагина од аспартата.

ATP - аденозин трифосфат.

bar gene - /енг. *bialaphos resistance gene*/ ген који кодира фосфинотрицин ацетил-трансферазу. Видети *PAT*.

bp - /енг. *base pairs*/ базних парова.

cDNA - комплементарна ДНК. ДНК синтетисана са РНК матрице помоћу ензима реверзне транскриптазе.

CTAB - хексадецил-триметил-амонијум-бромид (цетилтриметиламонијум-бромид), сурфактант који се користи при екстракцији ДНК.

cTP - /енг. *chloroplast targeting peptide*/ секвенца на *N*-терминусу протеина која се одсеца приликом уноса протена у хлоропласт, а служи за обележавање једарних протеина за транспорт у хлоропласт.

DAS - /енг. *days after sowing*/ дана након сејања

DEPC - диетилпирокарбонат, ирверзибилни инхибитор рибонуклеаза.

DSH - /енг. *direct stimulation hormesis*/ хормеза изазвана директном стимулацијом.

EDTA - етилендиаминтетрацетат, хелирајући реагенс.

EMSA - /енг. *electrophoretic mobility shift assay*/ електрофоретска техника за испитивање интеракција између макромолекула и лаганда, која се заснива на различитим електрофоретским мобилностима самог макромолекула и макромолекула са везаним лигандом. Најчешће се користи за испитивање интеракција између одређеног протеина и одређене ДНК или РНК секвенце.

Fd-GOGAT - фередоксин зависна глутамат-синтаза (*EC* 1.4.7.1). Видети *GOGAT*.

Fisher LSD - *Fisher*-ов тест најмање значајних разлика је статистичка метода за поређење више група података након анализе варијансе.

FR - /енг. *far red light*/ далека црвена светлост, 705–740 *nm*, део спектра који инактивира фитохром.

GA3 - гиберелинска киселина.

GDH - глутамат-дехидрогеназа (*EC* 1.4.1.2), ензим који каталише реверзну реакцију деаминације глутамата до 2-оксоглутарата.

GFP - /енг. *green fluorescent protein*/ зелени флуоресцентни протеин изолован из билуминцентних медуза који се, између осталог, користи и као маркер за локализацију експресије гена.

GOGAT - глутамат-синтаза, ензим који каталише синтезу два молекула глутамата од глутамин и 2-оксоглутарата користећи редукујуће еквиваленте пореклом од фередоскина или *NADH*.

GS - глутамин-синтетаза (*EC* 6.3.1.2), ензим који каталише синтезу глутамин од амонијум-јона и глутамата.

GS1 - цитосолна глутамин-синтетаза.

GS2 - хлоропластна глутамин-синтетаза.

GS1 - глутамин-синтетаза тип *I* која је присутна код прокатриота.

GSII - глутамин-синтетаза тип *II* која је присутна код еукариота.

GSIII - глутамин-синтетаза тип *III* која је пронађена код поједних врста прокариота.

Hepes - 2-[4-(2-хидроксиетил)пиперазин-1-ил]етансулфонска киселина. Цвитерјонски пуфер са $pK_a = 7,5$.

KIN - кинетин, синтетички цитокинин.

knockout мутација - мутација којом се омета функционалност гена.

MS - базални медијум за гајање биљака *in vitro* (*Murashige* и *Skoog*, 1962).

MSO - метионин-сулфоксимин, инхибитор глутамин-синтетаза.

MSO-P - метионин-сулфоксимин-фосфат.

MW - /енг. *molecular weight*/ молекулска маса.

NAD⁺ / *NADH* - оксидовани и редуковани облик никотинамид аденин динуклеотида, коензима који учествује редокс реакцијма.

NADH-GOGAT - *NADH* зависна глутамат-синтаза (*EC* 1.4.1.14). Видети *GOGAT*.

NASC - /енг. *The Nottingham Arabidopsis Stock Centre*/ библиотека семена *Arabidopsis*-а у Нотингему, Енглеска.

NiR - нитрит-редуктаза (*EC* 1.7.7.1), ензим који каталише редукцију нитрита до амонијум-јона. Код биљака овај ензим користи редукујуће еквиваленте пореклом од фередоксина.

Nr - нитрат-редуктаза (*EC* 1.7.1.1-3), ензим који каталише редукцију нитрата до нитрита коришћењем редукујућих еквивалентата пореклом од *NAD(P)H*.

OCSH - /енг. *overcompensation stimulation hormesis*/ хормеза проузрокована стимулацијом услед превелике компензације.

PAT - фосфинотрицин ацетил-трансфераза (*EC* 2.3.1.183), ензим који каталише ацетилацију фосфинотрицина.

PCR - /енг. *polymerase chain reaction*/ полимеразна ланчана реакција.

pI - изоелектрична тачка, представља *pH* вредност на којој је одређени протеин неутрално наелектрисан.

PPT - фосфинотрицин, инхибитор глутамин-синтетазе.

PPT-P – фосфинотрицин-фосфат.

qPCR - /енг. *quantitative PCR*/ квантитативни *PCR*, метода која подразумева мерење броја синтетисаних ампликона након сваког циклуса *PCR* амплификације, на основу чега се може закључити о почетној количини одговарајуће ДНК секвенце.

R - /енг. *red light*/ црвена светлост, 650–670 *nm*, део спектра који активира фитохром.

RT-PCR - полимеразна ланчана реакција у којој се као матрица користи *cDNA* синтетисана реверзном траскрипцијом.

SAIL - /енг. *The Syngenta Arabidopsis Insertion Library*/ *Syngenta*-ина библиотека Т-ДНК инсерционих линија *Arabidopsis*-а.

SALK - /енг. *The Salk Institute sequence-indexed library of insertion mutations in the arabidopsis genome*/ библиотека Т-ДНК инсерционих линија *Arabidopsis*-а *SALK* инситута, Сан Дијего, САД.

SDS – натријум-додецилсулфат, анјонски детергент који се рутински користи за денатурацију протеина у циљу њиховог електрофоретског раздвајања према маси.

Sephadex - зрнасти модификовани декстран, чији су ланци умрежени како би се добила тродимензионална, ригидна полисахаридна мрежа.

T_m - температура топљења ДНК, температура при којој 50 % двоструких ДНК хеликса дисосује на једноланчане ДНК.

T-PBS - физиолошки раствор са фосфатним пуфером и *Tween-20* детергентом.

Tris - 2-амино-2-хидроксиметил-пропан-1,3-диол. Пуфер са *pKa* 8,07.

ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина.

иРНК - инфромациона рибонуклеинска киселина.

РНК - рибонуклеинска киселина.

Студентов т-тест - статистичка метода за поређење две групе података.

Т-ДНК - трансферована ДНК. Део ДНК секвенце тумор индукујућег (*Ti*) плазида бактерија *Agrobacterium tumefaciens* и *Agrobacterium rhizogenes*, који се насумично инкорпорира у ДНК ланац биљке домаћина.

Биографија аутора

Милан Б. Драгићевић рођен је 15.09.1983. године у Параћину, а основну и средњу школу је завршио у Београду. Хемијски факултет Универзитета у Београду уписао је школске 2002/2003. године на студијској групи Биохемија. Дипломирао је 2007. године са просечном оценом 9,65 и стекао звање дипломирани биохемичар. Докторске студије уписао је школске 2007/2008. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, у оквиру студијске групе Биохемија.

Од јануара 2008. до октобра 2010. био је докторант стипендиста Министарства за науку Републике Србије. Од 01. октобра 2010. године запослен је у Институту за биолошка истраживања “Синиша Станковић”, на Одељењу за физиологију биљака као истраживач приправник, а од 19.04.2011. као истраживач сарадник. У периоду од јануара 2008. до краја 2010. године ангажован је на научно-истраживачком пројекту финансираном од стране Министарства за науку Републике Србије под бројем 143031Б, од 2010. године на међународном истраживачком ФП7 пројекту „*Terpmed*“, под бројем 227448, а од јануара 2011. године на пројекту „Физиолошка, хемијска и молекуларна анализа диверзитета ретких и угрожених биљних врста у циљу *ex situ* заштите и продукције биолошки активних једињења”, финансираном од стране Министарства просвете и науке Републике Србије, под бројем 173024.

Добитник је специјалног признања Српског хемијског друштва за изузетан успех током студија 2008. године. Добитник је награде за најуспешнији постер скупа на XIX симпозијуму Друштва за физиологију биљака Србије 2011. године.

Милан Драгићевић је члан Европског друштва за биљну биологију (*FESPB*) и Друштва за физиологију биљака Србије.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милан Драгићевић

број уписа 10/2007

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа субјединичног састава и регулације изоформи глутамин-синтетазе код биљака *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и *Lotus corniculatus* L.

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 19.06.2013.

Милан Драгићевић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милан Драгићевић

Број уписа 10/2007

Студијски програм Доктор биохемијских наука

Наслов рада Анализа субјединичног састава и регулације изоформи глутамин-синтетазе код биљака *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и *Lotus corniculatus* L.

Ментор др Радивоје Продановић, др Ана Симоновић

Потписани Милан Драгићевић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 19.06.2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Анализа субјединичног састава и регулације изоформи глутамин-синтетазе код биљака *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и *Lotus corniculatus* L.

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 19.06.2013.

