

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Neda A. Aničić

**Metabolizam nepetalaktona u listovima odabраниh
vrsta roda *Nepeta* (Lamiaceae) i njegova regulacija
tokom dehidracije**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Neda A. Aničić

**Metabolism of nepetalactone in leaves of selected
species of the genus *Nepeta* (Lamiaceae) and its
regulation during dehydration**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Komisija za odbranu doktorske disertacije

Mentori: _____

dr Dragana Matekalo, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Tamara Rakić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije: _____

dr Danijela Mišić, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Aneta Sabovljević, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Boban Anđelković, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Doktorska teza je urađena u okviru projekta osnovnih istraživanja „Fiziološka, hemijska i molekularna analiza diverziteta retkih i ugroženih biljnih vrsta u cilju *ex situ* zaštite i produkcije biološki aktivnih jedinjenja”, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (OI173024).

Duboku zahvalnost dugujem dragoj mentorki, dr Dragani Matekalo, na svom znanju koje je podelila sa mnom, na dugim diskusijama, strpljenju i pozitivnoj energiji bez kojih bi ovaj dug put bio mnogo teži. Srdačno se zahvaljujem dragoj mentorki, prof. dr Tamari Rakić, na velikoj podršci i predusretljivosti, kao i na korisnim sugestijama, koji su značajno doprineli u uobličavanju teksta ove disertacije.

Beskrajnu zahvalnost dugujem dragoj dr Danijeli Mišić; pre svega na ukazanom poverenju da budem deo njene istraživačke grupe, a zatim i na neizmernoj posvećenosti, entuzijazmu i strpljenju, koje mi je nesebično pružala u svim fazama izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se dr Bobanu Anđelkoviću na angažovanju u realizaciji NMR analiza i pomoći u tumačenju i prezentovanju rezultata. Veliko hvala i prof. dr Aneti Sabovljević na uloženom trudu i konstruktivnim sugestijama.

Posebnu zahvalnost dugujem dragoj dr Marijani Skorić za angažovanje u realizaciji eksperimenata iz ove disertacije, za pomoć oko uobličavanja teksta, ali i na ogromnoj podršci i toplim rečima u svim teškim trenucima. Srdačno se zahvaljujem dr Jasmini Nestorović Živković za angažovanje u realizaciji eksperimenta dehidratacije, ali i za svu pozitivnu energiju i bodrenje.

Veliku zahvalnost upućujem dr Mileni Dimitrijević i Jeleni Dumanović na realizaciji *GC-MS* analiza, kao i dr Urošu Gašiću na tumačenju rezultata *UHPLC/LTQ - OrbiTrap MS* analize. Hvala i dr Milici Radibratović na realizaciji 3D modelovanja proteina. Zahvaljujem se dr Ani Ćirić na angažovanju u realizaciji eksperimenata iz oblasti antimikrobnog dejstva. Veliko hvala i dr Milanu Dragičeviću za pomoć oko statističke obrade rezultata, kao i za i preneseno znanje. Izuzetnu zahvalnost dugujem dr Ilinki Pećinar na realizaciji Ramanove spektroskopije i svetlosne mikroskopije. Zahvalnost na angažovanju u eksperimenatima iz oblasti imunomodulacijskog dejstva dugujem dr Bojanu Jevtiću. Hvala i dr Jovani Hrustić na ukazanom gostoprimstvu tokom eksperimenata rekombinantne ekspresije u *E.coli*, kao i dr Milošu Brkušaninu na realizaciji sekvenciranja.

Svim kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka želim ovom prilikom da se zahvalim na kolegijalnosti i pozitivnoj energiji, a naročito dr Slavici Dmitrović, dr Branislavu Šileru, dr Suzani Živković, dr Tijani Banjanac, dr Jeleni Savić, dr Biljani Filipović i Luki Petroviću. Posebnu zahvalnost dugujem dr Milici Milutinović na „čestitkama” iz Amerike, kao i Jeleni Božunović – mojim „malim i nebitnim” kompanjonima.

Hvala svim mojim prijateljima što su bili uz mene tokom ovog dugog perioda.

Mojim roditeljima, Andriji i Nadeždi, kao i sestri Andrijani, zahvaljujem se na svojoj ljubavi i podršci, koju su mi pružali tokom čitavog života. Njima ovu tezu i posvećujem.

Metabolizam nepetalaktona u listovima odabranih vrsta roda *Nepeta* (Lamiaceae) i njegova regulacija tokom dehidratacije

Sažetak

Specijalizovani metabolizam roda *Nepeta* (Lamiaceae) karakteriše monoterpenoidni iridoid nepetalakton (NL), koji se javlja u vidu 4 diastereoizomera sa 7S konfiguracijom. Iako se dosta zna o biološkim aktivnostima NL, nedovoljno je istražen njegov metabolizam, kao i uloga u biljkama. Ova doktorska disertacija po prvi put opisuje mehanizme regulacije biosinteze NL tokom dehidratacije u listovima vrsta *Nepeta rtanjensis* Diklić & Milojević i *N. argolica* Bory & Chaub subsp. *argolica*, koje su adaptirane na kserotermna staništa. Uprkos koordinisanom sniženju ekspresije kandidata 10 gena biosintetskog puta iridoida i redukovanoj metaboličkoj aktivnosti, ove vrste su razvile mehanizme za očuvanje nivoa NL u uslovima vodnog deficita. U ovim mehanizmima značajnu ulogu imaju transkripcioni faktori MYC2 i YABBY5 kao pozitivni regulatori biosinteze NL, snižen intenzitet katabolizma NL, kao i očuvanje morfologije glandularnih trihoma, koji predstavljaju glavno mesto biosinteze i akumulacije NL. Iridoid sintaze, čija je funkcija potvrđena enzimatskim *in vitro* testovima sa rekombinantnim proteinima eksprimiranim u heterologom domaćinu *Escherichia coli*, eksprimiraju se kako kod *N. rtanjensis* (NrIS2) i *N. sibirica* L. (NsIS), koje produkuju NL, tako i kod *N. nervosa* L. (NnIS) koja se odlikuje odsustvom merljivih količina NL u tkivima. *N. nervosa* očigledno poseduje biosintetsku platformu za produkciju iridoida, koja je neaktivna, najverovatnije usled „gašenja” ili „stišavanja” funkcije nekog gena uzvodno u biosintetskom putu. Rasvetljavanjem mehanizama regulacije metabolizma NL kod vrsta roda *Nepeta* date su smernice za buduću primenu metaboličkog inženjeringa u cilju optimizacije proizvodnje NL, dok je *N. nervosa* izdvojena kao interesantna model vrsta za ova istraživanja.

Ključne reči: *cis,trans*-nepetalaktol, dehidratacija, funkcionalna karakterizacija gena, iridoid sintaza, *Nepeta*, nepetalakton, polietilen glikol, transkripcioni faktori

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka

UDK broj: 581.13:582.929.4:547.597(043.3)

Metabolism of nepetalactone in leaves of selected species of the genus *Nepeta* (Lamiaceae) and its regulation during dehydration

Abstract

The specialized metabolism of the genus *Nepeta* (Lamiaceae) is distinguished by the monoterpenoid iridoid nepetalactone (NL), which exists in the form of 4 diastereoisomers with a 7*S* configuration. Although its biological activities are well-studied, the NL metabolism, as well as its role in plants, is not well understood. Results of this doctoral thesis describe the regulatory mechanisms determining NL biosynthesis during dehydration, in leaves of *Nepeta rtanjensis* Diklić & Milojević and *N. argolica* Bory & Chaub subsp. *argolica*, which are adapted to xerothermic habitats. Despite a coordinated decrease in the expression of 10 candidate iridoid-related biosynthetic genes and reduced metabolic activity, these species have developed mechanisms to preserve NL levels under water deficit conditions. These mechanisms include the significant role of MYC2 and YABBY5 transcription factors as positive regulators of NL biosynthesis, reduced intensity of NL catabolism, and preservation of the morphology of glandular trichomes – the major site of NL biosynthesis and accumulation. Iridoid synthases, functionally characterized by *in vitro* enzymatic assays using recombinant proteins heterologously expressed in *Escherichia coli*, are expressed in NL-producing *N. rtanjensis* (NrIS2) and *N. sibirica* L. (NsIS), as well as in *N. nervosa* L. (NnIS), which is characterized by the absence of NL in tissues. *N. nervosa* probably possesses inactive iridoid biosynthetic platform, most likely due to the "switching off" or "silencing" of some genes upstream in the pathway. Elucidation of the regulatory mechanisms behind NL metabolism in *Nepeta*, provides the background for future metabolic engineering of NL production, and highlights *N. nervosa* as an interesting model species for future studies.

Key words: *cis,trans*-nepetalactol, dehydration, functional characterization of genes, iridoid synthase, *Nepeta*, nepetalactone, polyethylene glycol, transcription factors

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Plant physiology

UDK number: 581.13:582.929.4:547.597(043.3)

Lista skraćenica

8HGO – 8-hidroksigeraniol oksidaza
A549 – ćelije humanog adenokarcinoma
AACT – acetil-CoA acetiltransferaza
ABA – apscisinska kiselina
ANOVA – analiza varijanse
BASTA – komercijalni herbicid sa glufosinat-amonijumom
bp – bazni par
C32 – ćelije humanog melanoma
cDNK – komplementarni lanac DNK
CDP-MEP – 4-difosfocitidil-2-*C*-metil-*D*-eritritol-2-fosfat
***cis,cis*-NL** – *cis,cis*-nepetalakton
***cis,trans*-NL** – *cis,trans*-nepetalakton
CMK – 4-(citidin 5-difosfo)-2-*C*-metil-*D*-eritritol kinaza
COI1 – transkripcioni faktor *Coronatine insensitive 1*
COSY – korelaciona spektroskopija
CTAB – heksadecil-3-metil-amonijum-bromid (eng. *cetyltrimethylammonium bromide*)
CTP – citidin-5'-trifosfat
CYP – superporodica P450 monooksigenaza
DA – Dark Aguti soj pacova
DEPC – dietil dikarbonat (eng. *diethylpyrocarbonate*)
DCM – dihlorometan
DMAPP – dimetilalil difosfat
DMSO – dimetil sulfoksid
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
DNL – dehidronepetalakton
DPT – dana PEG tretmana
DXP – 1-deoksi-*D*-ksilulozo-5-fosfat
DXR – 1-deoksi-*D*-ksilulozo-5-fosfat reduktoizomeraza
***e*DLA** – epideoksiloganinska kiselina
DTT – ditioneitol
EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina
EUNIS – organizacija EUNIS (eng. *European University Information Systems organization*)
EtBr – etidijum-bromidskra
FPP – farnezil difosfat
FPPS – gerani-transtransferaza
FPS – farnezildifosfat sintaza
G8O – geraniol-8-oksidaza
G10H – geraniol-10-hidroksilaza
GA-3P – *D*-gliceraldehid-3-fosfat
GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza
GC-MS – gasna hromatografija sa masenom spektrometijom
GES – geraniol sintaza
GGPP – geranilgeranil difosfat
GGPS – geranilgeranil difosfat sintaza
GPP – geranil difosfat
GPPS – geranil difosfat sintaza

GPPS-SSU – mala subjedinica geranil difosfat sintaza
HDS – 4-hidroksi-3-metilbut-2-enil-difosfat sintaza
HDR – 1-hidroksi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfat reduktaza
HeLa – ćelije humanog kancera cerviksa
HMBPP – 4-hidroksi-3-metil-butenil-1-difosfat
HMGR – hidroksimetilglutaril-CoA reduktaza
HMGS – 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A sintaza
HPPR – hidroksifenilpiruvat reduktaza
IDI – izopentenil difosfat delta-izomeraza
IL-1 β – interleukin-1-beta
IL-6 – interleukin-6
IPP – izopentenil difosfat
IPTG – izopropil- β -D-tiogalaktozid
IS – iridoid sintaza
JA - jasmonat
JAZ3– *Jasmonate-ZIM domain*
K562 – ćelije humane eritroleukemije
kb – kilobaza
kDa – kilodalton
LB – Luria-Bertani hranljiva podloga korišćena za gajenje bakterija
LS-174 – ćelije humanog karcinoma kolona
MBC – minimalna baktericidna koncentracija
MDA-MB-231 – ćelijska linija tumora dojke
MDD – mevalonat difosfat dekarboksilaza
MEcPP – 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciklodifosfata
MCT – 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat, citidilil-transferaza
MDS – 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciklodifosfat sintaza
MEP – metileritritol fosfatni biosintetski put
MFC – minimalna fungicidna koncentracija
MIC – minimalna inhibitorna koncentracija
MK – mevalonat fosfotransferaza
MOPS – 3-(N-morfolino) propansulfonska kiselina
MS – hranljiva podloga po Murashige i Skoog-u (1962)
MT – mehanički trihomi
MVA – mevalonatni biosintetski put
MVAP – mevalonat- 5-fosfat
MVAPP – mevalonat 5-difosfat
MVK – metil vinil keton
MYB – transkripcioni factor sa MYB domenom
MYC2 – transkripcioni factor MYC2 (eng. *Mouse-ear cress 2*)
NCBI – Nacionalni Centar za Biotehnoške Informacije (eng. eng. *National Center for Biotechnology Information*)
NFDM – bezmasno mleko u prahu (eng. *non-fat dry milk*)
NEPS – kratkolančana-dehidrogenaza/reduktaza vezana za nepetalaktol (eng. *nepetalactol-related-short-chain-dehydrogenase/reductase, NEPS*)
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NL – nepetalakton
NMR – nuklearna magnetna rezonanca
OD – optička gustina (eng. *optical density*)

P5 β R – progesteron-5- β -reduktaza
PCR – reakcija lančanog umnožavanja, (eng. *polymerase chain reaction*)
PDB – proteinska baza podataka (eng. *Protein Data Bank*)
PEG – polietilen glikol
PGT – peltatni glandularni trihomi
PRISE – grupa enzima sa aktivnošću progesteron-5 β -reduktaze i/ili iridoid sintaze (eng. *progesterone-5 β -reductase and/or iridoid synthase displaying enzymes*).
PSII – fotosistem II
qPCR – kvantitativni PCR
RA – ruzmarinska kiselina
RACE – brza amplifikacija cDNK krajeva (eng. *Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE*)
RAW 264,7 – ćelijska linija makrofaga miša
RNK – ribonukleinska kiselina
ROS – reaktivne vrste kiseonika
rpm – obrtaji u minuti (eng. *Rotation Per Minute*)
RT – reverzna transkripcija
RWC – relativni sadržaj vode
SD – standardna devijacija
SDS – natrijum dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*)
SE – standardna greška
SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija
SQS – skvalen sintaza
TF – transkripcioni faktor
T_m – tačka topljenja
TNF – faktor nekroze tumora
TPS – terpenske sintaze
trans,cis-NL – *trans,cis*-nepetalakton
trans,trans-NL – *trans,trans*-nepetalakton
Tris – hidroksimetil-aminometan
YABBY5 – transkripcioni faktor iz porodice YABBY

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Osnovne karakteristike roda <i>Nepeta</i>	1
1.1.1. Biološke aktivnosti vrsta roda <i>Nepeta</i>	1
1.1.2. Botaničke karakteristike odabranih vrsta roda <i>Nepeta</i>	3
1.1.2.1. <i>Nepeta rtanjensis</i> Diklić i Milojević.....	3
1.1.2.2. <i>Nepeta argolica</i> Bory i Chaub subsp. <i>argolica</i>	4
1.1.2.3. <i>Nepeta parnassica</i> Heldr. i Sart.....	4
1.1.2.4. <i>N. ernesti-mayeri</i> Diklić i Nikolić	5
1.1.2.5. <i>Nepeta sibirica</i> L.	5
1.1.2.6. <i>Nepeta nervosa</i> Royle ex Benth.	6
1.2. Specijalizovani metabolizam biljaka i njegov ekološki i komercijalni značaj.....	6
1.2.1. Terpeni i terpenoidi kao specijalizovani metaboliti biljaka.....	7
1.2.2. Nepetalakton – karakteristike, derivati i ekološka uloga.....	8
1.2.3. Biosintetski put terpena	10
1.2.4. Biosinteza nepetalaktona	12
1.2.5. Kratkolančane dehidrogenaze/reduktaze i njihova uloga u biosintezi nepetalaktona	14
1.2.6. Transkripciona regulacija glavnog puta biosinteze iridoida.....	15
1.3. Glandularni trihomi kao mesta sinteze specijalizovanih metabolita.....	16
1.4. Abiotički stres i odgovor specijalizovanog metabolizma biljaka.....	17
1.4.1. Vodni deficit i njegov uticaj na fiziologiju biljaka i produkciju specijalizovanih metabolita.....	18
1.4.2. Kvantifikacija vodnog deficita i upotreba polietilen glikola (PEG) u eksperimentalnom modelu dehidracije.....	19
1.4.3. Vodni deficit i produkcija terpenoida kod porodice Lamiaceae.....	20
2. Cilj rada	23
3. Materijal i metode	24
3.1. Morfolološka i hemijska karakterizacija listova <i>N. rtanjensis</i>	24
3.1.1. Biljni materijal	24
3.1.2. Izolacija glandularnih trihoma abrazijom suvim ledom	24
3.1.3. Svetlosna mikroskopija.....	24
3.1.4. Ramanova spektroskopija.....	24
3.1.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	25

3.1.6. Ekstrakcija sadržaja žlezdanih dlaka dihlorometanom.....	25
3.1.7. Priprema metanolnih ekstrakata	25
3.1.8. <i>Orbitrap-MS</i> analiza sadržaja nepetalaktona.....	25
3.1.9. <i>UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS</i> analiza sadržaja nepetalaktona.....	26
3.1.10. Gasna hromatografija sa masenom detekcijom (<i>GC-MS</i>) u analizi metanolnog ekstrakta <i>N. rtanjensis</i>	26
3.2. Analiza ekspresije gena biosintetskog puta nepetalaktona u listovima <i>N. rtanjensis</i> različitog razvojnog stadijuma i u izolovanim trihomima listova	27
3.2.1. Izolacija RNK	27
3.2.2. Reverzna transkripcija i sinteza komplementarne DNK (cDNK)	27
3.2.3. Sekvenciranje transkriptoma i pretraga za genima kandidatima biosintetskog puta nepetalaktona i regulatornim transkripcionim faktorima	28
3.2.4. Konstrukcija prajmera	28
3.2.5. Kvantitativni <i>PCR</i> u realnom vremenu (<i>RT-qPCR</i>)	28
3.2.6. Statistička obrada podataka	29
3.3. Eksperimentalna dehidracija izdanaka <i>N. rtanjensis</i> i <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i> korišćenjem polietilen glikola (PEG).....	30
3.3.1. Biljni materijal	30
3.3.2. Uspostavljanje i održavanje <i>in vitro</i> kultura izdanaka vrsta roda <i>Nepeta</i>	30
3.3.3. Eksperimentalna indukcija dehidracije kod dve vrste roda <i>Nepeta</i> pod uticajem PEG-a ..	30
3.3.4. Određivanje relativnog sadržaja vode	32
3.3.5. <i>UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS</i> analiza sadržaja nepetalaktona.....	32
3.3.6. Izolacija RNK	32
3.3.7. Kvantitativni <i>PCR</i> u realnom vremenu (<i>RT-qPCR</i>)	32
3.3.8. Statistička obrada podataka	33
3.3.9. Filogenetska analiza.....	33
3.4. Izolacija i funkcionalna karakterizacija iridoid sintaza (IS) iz nekoliko vrsta roda <i>Nepeta</i>	33
3.4.1. Izolacija pune dužine gena za iridoid sintazu (IS).....	33
3.4.1.1. Biljni materijal	33
3.4.1.2. Izolacija RNK	34
3.4.1.3. Konstrukcija prajmera.....	34
3.4.1.4. Umnožavanje fragmenta genskih sekvenci <i>PCR</i> tehnikom	34
3.4.1.5. Brza amplifikacija cDNK krajeva (<i>RACE</i>)	34
3.4.1.6. Umnožavanje pune dužine gena kandidata za iridoid sintazu iz <i>N. parnassica</i> , <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i> , <i>N. ernesti-mayeri</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i>	36

3.4.1.7. Dodavanje restrikcionih mesta na sekvence gena kandidata za IS pomoću <i>PCR</i> tehnike	37
3.4.1.8. Prečišćavanje fragmenata DNK iz agaroznog gela	39
3.4.2. Heterologa ekspresija iridoid sintaza u <i>E. coli</i> i prečišćavanje rekombinantnih proteina	39
3.4.2.1. Bakterijski sojevi i hranljive podloge	39
3.4.2.2. Priprema hemijski kompetentnih ćelija sojeva <i>E. coli</i>	40
3.4.2.3. Transformacija kompetentnih ćelija <i>E. coli</i>	40
3.4.2.4. Plazmidni vektori	41
3.4.2.5. Kloniranje	43
3.4.2.5.1. TA kloniranje	43
3.4.2.5.2. Kloniranje bazirano na restrikcionim enzimima	44
3.4.2.6. Kolonijski <i>PCR</i>	46
3.4.2.7. Prečišćavanje plazmida iz bakterijskih ćelija	46
3.4.2.8. Heterologa ekspresija gena kandidata iridoid sintaza u <i>E. coli</i>	46
3.4.2.9. Prečišćavanje proteina obeleženih polihistidinskim nastavcima u nativnim uslovima ..	47
3.4.2.10. <i>SDS-PAGE</i> elektroforeza i bojenje proteina pomoću <i>Coomasie blue</i> reagensa	48
3.4.2.11. Imunodetekcija proteina (eng. <i>Immuno blotting</i>)	48
3.4.3. Funkcionalna karakterizacija iridoid sintaza iz nekoliko vrsta roda <i>Nepeta</i>	49
3.4.3.1. <i>In vitro</i> enzimski esej za potvrdu funkcije iridoid sintaza	49
3.4.3.2. Analiza produkata enzimske reakcije gasnom hromatografijom sa masenom detekcijom (<i>GC-MS</i>)	49
3.4.3.3. NMR analiza produkata enzimske reakcije	49
3.4.3.4. Uporedna analiza ekspresije funkcionalno okarakterisanih iridoid sintaza i profilisanje iridoida u različitim organima vrsta roda <i>Nepeta</i>	50
3.4.3.4.1. Biljni materijal	50
3.4.3.4.2. Izolacija RNK i kvantitativni <i>PCR</i> u realnom vremenu (<i>RT-qPCR</i>)	50
3.4.3.4.3. <i>UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS</i> analiza sadržaja nepetalaktona	50
3.4.3.5. Filogenetska analiza	50
3.4.3.6. 3D modelovanje funkcionalno okarakterisanih iridoid sintaza	50
3.5. Analiza bioloških aktivnosti ekstrakata listova odabranih vrsta roda <i>Nepeta</i>	51
3.5.1. Priprema ekstrakata listova <i>Nepeta rtanjensis</i> i <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i> i čistih jedinjenja	51
3.5.2. <i>UHPLC/(±)HESI-MS/MS</i> metaboličko profilisanje iridoida i fenola u metanolnim ekstraktima listova <i>Nepeta rtanjensis</i> i <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i>	51
3.5.3. Antimikrobno dejstvo	52

3.5.3.1. Testirani mikroorganizmi.....	52
3.5.3.2. Referentni antibiotici i antimikotici.....	52
3.5.3.3. Priprema mikrobnih sojeva i mikrodiluciona metoda.....	52
3.5.4. Imunomodulacijsko dejstvo.....	53
3.5.4.1. Izolacija makrofaga iz ćelija pacova.....	53
3.5.4.2. Merenje produkcije citokina metodom <i>ELISA</i>	53
3.5.4.3. Merenje nivoa fagocitoze.....	54
3.5.4.4. Merenje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (<i>ROS</i>) i azot monoksida (<i>NO</i>).....	54
4. Rezultati	55
4.1. Određivanje mesta biosinteze i akumulacije nepetalaktona u listovima <i>N. rtanjensis</i> na nivou tkiva	55
4.1.1. Identifikacija nepetalaktona u metanolnom ekstraktu listova <i>N. rtanjensis</i>	55
4.1.2. Usporedna analiza nivoa ekspresije <i>IS</i> i sadržaja <i>NL</i> i <i>DNL</i> u različitim fazama razvića listova <i>N. rtanjensis</i>	56
4.1.3. Analiza sadržaja trihoma i listova <i>N. rtanjensis</i> nakon abrazije suvim ledom pomoću <i>UHPLC/(+)HESI-MS/MS</i> i Ramanove spektroskopije.....	56
4.1.4. Analiza sadržaja nepetalaktona u glandularnim trihomima <i>N. rtanjensis</i>	59
4.1.5. Biosinteza nepetalaktona se specifično odvija u izolovanim trihomima listova <i>Nepeta rtanjensis</i>	60
4.2. Promene u metabolizmu nepetalaktona u listovima <i>N. rtanjensis</i> i <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i> tokom eksperimentalno indukovane dehidratacije polietilen glikolom (<i>PEG</i>).....	62
4.2.1. Uticaj polietilen glikola (<i>PEG-a</i>) na promene morfoloških i fizioloških parametara jedinki <i>N. rtanjensis</i> i <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i>	62
4.2.2. Uticaj <i>PEG-a</i> na metabolički profil nepetalaktona u listovima <i>N. rtanjensis</i> i <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i>	62
4.2.3. Analiza ekspresije pretpostavljenih gena biosintetskog puta nepetalaktona u listovima dve vrste roda <i>Nepeta</i> tokom dehidratacije.....	65
4.2.4. Transkripciona regulacija metabolizma nepetalaktona u trihomima listova <i>N. rtanjensis</i> i <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i> tokom dehidratacije.....	67
4.3. Identifikacija i funkcionalna karakterizacija gena koji kodiraju za iridoid sintazu (<i>IS</i>) u listovima vrsta roda <i>Nepeta</i>	69
4.3.1. Izolacija fragmenta gena kandidata za iridoid sintazu iz glandularnih trihoma <i>N. rtanjensis</i>	69
4.3.2. Izolacija punih dužina gena za iridoid sintazu iz nekoliko vrsta roda <i>Nepeta</i> i njihova filogenetska analiza.....	71
4.3.3. Funkcionalna <i>in vitro</i> karakterizacija iridoid sintaza iz vrsta roda <i>Nepeta</i> eksprimiranih u bakteriji <i>E. coli</i>	74

4.3.4.	Analiza strukturnih razlika u aktivnim mestima funkcionalno okarakterisanih iridoid sintaza iz tri vrste <i>Nepeta</i> (NrIS2, NsIS i NnIS) i poznatih IS iz različitih vrsta	79
4.3.5.	Poređenje ekspresija funkcionalno okarakterisanih IS kod vrsta roda <i>Nepeta</i> koje ne proizvode i kod onih koje dominantno proizvode različite stereoizomere NL	83
4.4.	Ispitivanje bioloških aktivnosti metanolnih ekstrakata i dominantnih iridoidnih i fenolnih jedinjenja listova <i>N. rtanjensis</i> i <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i>	85
4.4.1.	Metaboličko profilisanje iridoida i fenola u metanolnim ekstraktima listova <i>N. rtanjensis</i> i <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i>	85
4.4.2.	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata i dominantnih iridoidnih i fenolnih jedinjenja listova <i>N. rtanjensis</i> i <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i>	86
4.4.3.	Imunomodulacijski uticaj metanolnih ekstrakata listova <i>N. rtanjensis</i> i <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i> i izolovanih dominantnih nepetalaktona na makrofage <i>in vitro</i>	88
5.	Diskusija.....	90
5.1.	Biosinteza i akumulacija nepetalaktona na nivou tkiva i razvojnih stadijuma listova <i>N. rtanjensis</i>	91
5.2.	Metabolizam nepetalaktona u listovima <i>N. rtanjensis</i> i <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i> tokom dehidratacije izazvane polietilen glikolom (PEG).....	94
5.3.	Funkcionalne iridoid sintaze nalaze se u vrstama roda <i>Nepeta</i> koje proizvode nepetalakton, ali i u onima koje ga ne proizvode.....	103
5.3.1.	Izolacija i funkcionalna karakterizacija iridoid sintaza iz tri vrste roda <i>Nepeta</i>	104
5.3.2.	Funkcionalno okarakterisani IS ekspimiraju se kod vrsta roda <i>Nepeta</i> , bez obzira da li one proizvode NL ili ne	108
5.4.	Biološke aktivnosti metanolnih ekstrakata i dominantnih iridoidnih i fenolnih jedinjenja listova <i>N. rtanjensis</i> i <i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i>	110
5.4.1.	Antimikrobno dejstvo	110
5.4.2.	Imunomodulacijsko dejstvo.....	112
6.	Zaključci.....	113
7.	Literatura.....	114
8.	Prilozi.....	139

1. Uvod

1.1. Osnovne karakteristike roda *Nepeta*

Jedan od najvećih rodova porodice Lamiaceae – rod *Nepeta*, deo je potporodice Nepetoideae i tribusa Nepetae (Takhtajan, 2009). Rod je dobio naziv po antičkom imenu današnjeg grada Nepi u Italiji (Etrurija) – Nepet ili Nepete (Marin i Tatić, 2004). Poznato je preko trista vrsta ovog roda, koje su uglavnom zeljaste višegodišnje biljke, a ponekad i jednogodišnje, čije rasprostranjenje obuhvata veći deo centralne i južne Evrope, Bliski istok, centralnu i južnu Aziju i delove Afrike (Formisano i sar., 2011). Biljke ovog roda imaju dekorativne cvetove prijatnog mirisa, dok su polenova zrna heksakolpatna (Cantino i sar., 1992). Najveći diverzitet i bogatstvo vrstama prisutni su u dvema oblastima: prva je Jugozapadna Azija, u okviru koje se posebno izdvajaju Turska i Iran; druga oblast obuhvata zapadne Himalaje, a uključuje i Hindu Kuš (Formisano i sar., 2011). Iran je centar porekla 75 vrsta roda *Nepeta*, pri čemu je 54% njih endemično (Jamzad i sar., 2003).

1.1.1. Biološke aktivnosti vrsta roda *Nepeta*

Brojne vrste roda *Nepeta* upotrebljavane su u narodnoj medicini kao diuretici, dijaforetici, antispazmotici, antiasmatici, sedativni agensi, kao i nakon ujeda zmija i škorpija zbog antiseptičkih i adstringentnih svojstava (Formisano i sar., 2011). Sva ova svojstva pripisuju se nepetalaktonu, jedinjenju iz grupe iridoida, koje preovlađuje u etarskim uljima. Generalno, razlikuju se dva glavna hemotipa etarskih ulja ovog roda: prvi je nepetalaktonski hemotip, u koji ulaze vrste koje proizvode diastereoizomere nepetalaktona. Kod ovog tipa, jedan od izomera nepetalaktona je često veoma dominantan konstituent, pa tako, na primer, u etarskom ulju *N. rtanjensis* preko 70% sadržaja čini *trans,cis*-NL, dok je *cis,trans*-izomer prisutan u mnogo manjem postotku (~16%) (Dmitrović i sar., 2016). Drugoj grupi pripadaju vrste hemotipa bogatog 1,8-cineolom i/ili linalolom, a koje proizvode etarska ulja s blagim mirisom koji podseća na mentol (Formisano i sar., 2011). Osim preovlađujućih monoterpena, u etarskim uljima ovih vrsta prisutni su i diterpeni, triterpeni, kao i flavonoidi i druga fenolna jedinjenja.

Još davne 1969. godine je prvi put utvrđeno jedinstveno halucinogeno dejstvo nepetalaktonskih izomera *N. cataria* na domaće mačke (*Felix domestica*) (Waller i sar., 1969), po kojem je vrsta popularna i široj javnosti, i zahvaljujući kojoj je dobila naziv mačija metvica (eng. *catnip* ili *catmint*). Od tada pa do danas, kroz pet decenija intenzivnih istraživanja, otkriveno je mnoštvo bioloških aktivnosti vrsta roda *Nepeta*, koja se često veoma razlikuju u zavisnosti od dominantno prisutnog stereoizomera nepetalaktona. Poznato je da etarsko ulje *N. cataria* pokazuje repelentnu aktivnost prema štetnim insektima kao što su bubašvabe (*Blattella germanica*, *Periplaneta americana*), muve (*Musca domestica*), buve roda *Culex* i komarci roda *Aedes* (Peterson i sar., 2002, Schultz i sar., 2004, Zhu i sar., 2009, Amer i Mehlhorn, 2006, Birkett i sar., 2011, Reichert i sar., 2019). Etarsko ulje *N. cataria* sadrži pretežno *cis,trans*-NL (70,4%), ali u manjem postotku i *trans,cis*-NL (6%). Za *trans,cis*-NL pokazano je da je veoma toksičan i da ima jače repelentno dejstvo na vrste roda *Blattella* (Gkinis i sar., 2003, Peterson i Coast, 2001, Peterson i sar., 2002), kao i da je jači feromon pčela od *cis,trans*-stereoizomera (Birkett i Pickett, 2003). Veoma snažnu repelentnu aktivnost prema komaracima pokazalo je i etarsko ulje *N. faassenii*, kao i *N. rtanjensis* i *N. parnassica*, dok je nešto slabiji bio efekat čistog *trans,cis*-NL izolovanog iz etarskog ulja *N. parnassica* (Ghaninia i sar., 2008, Gkinis i sar., 2014, Sparks i sar., 2017).

Fitotoksično dejstvo prema poznatim korovima *Lepidium sativum* i *Raphanus sativus* prikazale su brojne vrste roda *Nepeta*, kao što su *N. nuda*, *N. fassennii*, *N. curviflora*, *N. juncea*, kao i *N. rtanjensis*

(Eom i sar., 2006, Hussain i sar., 2009, Kobaisy i sar., 2006, Mancini i sar., 2009, Nestorović Živković i sar., 2016). Etarska ulja *N. rtanjensis* i *N. cataria* inhibiraju rast i indukuju oksidativni stres u izdancima ambrozije. Pri tome, *N. cataria*, koja dominantno proizvodi *cis,trans*-NL, ispoljava jači inhibički efekat na rast izdanaka, ali i podstiče aktivnost peroksidaza i katalaza. S druge strane, etarsko ulje *N. rtanjensis*, koje dominantno sadrži *trans,cis*-izomer, efikasnije sprečava rast korena, i aktivira superoksid dismutaze (Dmitrović i sar., 2015). Takođe, pokazano je da etarsko ulje *N. rtanjensis* može da umanji toksični efekat komercijalnog herbicida BASTA na *Arabidopsis thaliana*, te se može primenjivati kao prirodni agens za ublažavanje dejstva BASTA u zemljištu kontaminiranom reziduama ovog herbicida (Dmitrović i sar., 2019).

Snažno antimikrobno dejstvo prema bakterijama respiratornog trakta i kožnih infekcija pokazala su etarska ulja *N. cataria* i *N. cataria* var. *citrodora*, pri čemu su među najosetljivijima bile *Streptococcus pneumoniae* (MIC 0,016–0,03%), kao i *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis* (MIC 0,03–0,06%) (Suschke i sar., 2007). Antimikrobna aktivnost ulja *N. cataria* potvrđena je kod jedanaest vrsta bakterija i dvanaest vrsta gljiva, pri čemu su najosetljivije bile *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* i *Fusarium solani* (MIC 0,016%). Metanolni ekstrakt iste vrste je imao značajno slabije dejstvo i inhibirao je rast samo pet bakterija i sedam gljiva (Adiguzel i sar., 2009). Etarska ulja *N. camphorata* i *N. argolica* subsp. *dirphyha* snažno su inhibirala rast *Helicobacter pylori* (Kalpoutzakis i sar., 2001), dok je ulje *N. cadmea*, koje je veoma bogato *cis,trans*-NL, bilo efikasno protiv mnogih bakterijskih sojeva sa višestrukom rezistencijom na antibiotike (Saraç i sar., 2009). Pokazano je da etarsko ulje *N. rtanjensis* ima jako antibakterijsko dejstvo na *Aspergillus niger*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* i *Salmonella enteritidis*, dok su najosetljivije mikromicete bile dve vrste *Alternaria*, kao i *Cladosporium cladosporoides*, *Trichoderma viride*, i *Bipolaris spicifera* (MIC 0,6 do 1,4 mg/ml) (Stojanović i sar., 2005). Etarsko ulje *N. sibthorpii*, veoma bogato *cis,trans*-NL (83,1– 94,5%), pokazalo je antimikrobnu aktivnost prema *A. niger* i *S. aureus* (Galati i sar., 2006). *Cis,cis*-NL pripisuje se jaka antibakterijska aktivnost ulja *N. persica* prema *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* (Shafaghat i Oji, 2010). Veoma visok udeo (7*R*)-*trans,trans*-NL u ulju *N. elliptica* (>85%) odgovoran je za inhibiranje aktivnosti patogenih gljiva vrsta *Helminthosporium maydis*, *Fusarium oxysporum* i *Rhizoctonia solani*, pošto je sličan rezultat dobijen testiranjem čistog jedinjenja (7*R*)-*trans,trans*-NL (Kumar i sar., 2014). Etarsko ulje *N. meyeri*, u kojem zastupljenost *trans,cis*-stereoizomera NL prelazi 80%, pokazuje već u niskim koncentracijama antifungalnu aktivnost prema gotovo svim od šesnaest testiranih vrsta patogenih gljiva, većinom iz roda *Fusarium* (Kordali i sar., 2013).

Značajno analgetično i sedativno dejstvo poseduje etarsko ulje *N. caesarea*. Ovo svojstvo se pripisuje *cis,trans*-NL, za koje je ustanovljeno da poseduje specifičnu agonističku aktivnost opioidnog receptora (Aydın i sar., 1998). Sličan agonistički efekat je pokazan i kod ekstrakta *N. sibirica*, i na isti način je objašnjena pozadina snažne antinociceptivne aktivnosti koju ispoljava ova vrsta. Istovremeno, opioidni antagonist nije bio inhibiran dejstvom ekstrakta *N. grandiflora*, što je verovatno u vezi sa činjenicom da je nepetalakton u ekstraktima ove vrste ispod nivoa detekcije, pa je za jak antinociceptivni efekat verovatno odgovoran neki drugi metabolit (Vari i sar., 2001). Etarsko ulje vrste *N. crispa* je izazvalo antiinflamatorni efekat kod inflamacionog modela indukovanog formalinom i značajno je smanjilo edem šape pacova u svim aplikovanim dozama (Ali i sar., 2012). Takođe, Rigano i saradnici su potvrdili antiinflamatornu aktivnost etarskog ulja *N. glomerata*, koje je jako inhibiralo produkciju NO indukovanu lipopolisaharidom kod makrofagnih ćelijskih linija RAW 264,7 (Rigano i sar., 2011). Već u koncentraciji od 0,5 µl/ml, etarsko ulje *N. pogonosperma*, bogato *trans,cis*-stereoizomerom NL, značajno je smanjilo produkciju azot monoksida (NO) kod inflamiranih glijalnih ćelija pacova (Valimehr i sar., 2015).

Značajnu citotoksičnu aktivnost prema C32 amelanotičnom melanomu i ćelijama renalnog adenokarcinoma pokazalo je etarsko ulje *N. glomerata* (Rigano i sar., 2011), dok je ulje *N. rtanjensis*

snažno delovalo protiv ćelija različitih tipova humanog karcinoma – *HeLa*, *K562*, *A549*, *LS-174* i *MDA-MB-231* (Skorić i sar., 2017). Nezanemarljiv je uticaj alkoholnog ekstrakta *N. hindostana* na smanjenje serumskih lipida i nivoa lipoproteina, kao i na ozbiljnost arteroskleroze kod mladih svinja na različitim režimima ishrane (Agarwal i sar., 1978). Na osnovu ovog istraživanja proizvedena je herbalna formulacija *Lipotab*, koja se već godinama koristi kao sredstvo za smanjenje holesterola i triglicerida u krvi (Formisano i sar., 2011). Još jedno potencijalno aplikativno rešenje je sirup napravljen od ekstrakta *N. bracteata*, koji je značajno smanjio simptome alergijskog rinitisa kod testiranih pacijenata (Hajiheydari i sar., 2017).

1.1.2. Botaničke karakteristike odabranih vrsta roda *Nepeta*

1.1.2.1. *Nepeta rtanjensis* Diklić i Milojević

Zajedno sa *N. nuda* i *N. cataria*, *N. rtanjensis* jedan je od tri predstavnika roda *Nepeta* prisutnih u flori Srbije (Chalchat i sar., 2000). Vrsta *N. rtanjensis* je u narodu poznata kao rtanjska metvica, a prvi put je zabeležena 1976. godine na južnim padinama planine Rtanj, u severoistočnoj Srbiji (Diklić i Milojević, 1976). *N. rtanjensis* pripada sekciji *Pycnonepeta* Benth. i *N. sibthorpii* Benth. kompleksu, te je veoma srodna vrstama *N. camphorata*, *N. heldreichii*, *N. parnassica*, *N. spruneri*, *N. sibthorpii* (sin. *Nepeta argolica* subsp. *argolica*) i *N. dirphya*. Centar rasprostranjenja ovih vrsta je krajnji jug Balkanskog poluostrva, pa veoma udaljeni i izdvojeni severni areal *N. rtanjensis*, u odnosu na druge vrste kompleksa, otkriva reliktni karakter ove vrste (Diklić, 1999). Staništa na kojima se javlja *N. rtanjensis*, prema *EUNIS* nomenklaturi, pripadaju mezijskim žbunasto stepolikim zajednicama (E1.213) (Blaženčić i sar., 2005), a zajednica u okviru koje se nalazi je *Nepeto-Festucetum vallesiaca* (Diklić i Milojević, 1976). Staništa su opisana kao kserotermne, otvorene, niske travnato-žbunaste zajednice na plitkim kamenjarskim terenima (Blaženčić i sar., 2005). Ova staništa su suva i topla, nalaze se na nadmorskoj visini od 650 do 850 metara, a odlikuje ih plitko skeletno zemljište sa crvenicom. Stenoendemit *N. rtanjensis* nalazi se u kategoriji krajnje ugroženih taksona „Crvene knjige flore Srbije”, i kao prirodna retkost je zaštićena zakonom (Diklić, 1999). Ova vrsta je višegodišnja polužbunasta biljka sa četvorostranim stablom i visinom od 65 cm (**Slika 1a**). Listovi su pri osnovi srcasti, izduženo jajasti, tupo nazubljeni i prekriveni nežlezdanim i žlezdanim dlakama. Stablo i listovi ove vrste obrastaju indumentumom sa raznim tipovima žlezdanih i nežlezdanih dlaka. Cvast se sastoji od 35 cvetova zbijenih u 4 do 11 pršljenova, a brakteje su izduženo lancetaste. Čašica je valjkasta sa pet čašičnih zubaca jednakih dužina, a krunica beličasta sa ljubičastim pegama (Diklić i Milojević, 1976). Cvetanje traje od juna do jula, a plodonošenje je u avgustu i septembru. *N. rtanjensis* se oprašuje entomofilijom, a razvija plod u vidu jajaste orašice, koji se rasejava autohorno. Razmnožavanje je seksualno ili vegetativno iz odrvenelih donjih delova stabljike. Glavni konstituent etarskog ulja *N. rtanjensis* je *trans,cis*-nepetalakton, dok je u metanolnim ekstraktima dehidronepetalakton (DNL) detektovan kao dominantno jedinjenje (Mišić i sar., 2015).



Slika 1. *N. rtanjensis* na prirodnom staništu na planini Rtanj (a) i *N. argolica* subsp. *argolica* na Peloponezu (b). Isprekidanom crvenom linijom je odvojena slika cvasti *N. argolica* subsp. *argolica*. Izvor: Jasmina Nestorović Živković, privatna kolekcija.

1.1.2.2. *Nepeta argolica* Bory i Chaub subsp. *argolica*

Nepeta argolica subsp. *argolica* (sin. *Nepeta sibthorpii* Benth.) je višegodišnja zeljasta biljka, koja raste na suvim i kamenitim staništima južne Grčke. Ova vrsta je endemit južnog dela Balkanskog poluostrva (Tzakou i sar., 2000). Pripada sekciji *Pycnonepeta* Benth. i po ovaj vrsti je *N. sibthorpii* Benth. kompleks dobio ime. *N. argolica* je varijabilna vrsta i deli se na četiri podvrste – *N. argolica* subsp. *argolica*, *N. argolica* subsp. *dirphya*, *N. argolica* subsp. *vourinensis* (Baden) Strid & Kit Tan i *N. argolica* subsp. *malachotrichos* (Baden) Strid & Kit Tan. *N. argolica* subsp. *argolica* se javlja na Peloponezu i u centralnoj Grčkoj, *N. argolica* subsp. *dirphya* na ostrvu Eubeja, *N. argolica* subsp. *malachotrichos* je takson koji je zastupljen na planinama na severu centralne Grčke i u severoistočnim oblastima ove zemlje, dok *N. argolica* subsp. *vourinensis* raste na planinama na severu centralne Grčke (Georghiou i Delipetrou, 2010). Etarsko ulje *N. argolica* subsp. *argolica* ima veoma visok sadržaj *cis,trans*-nepetalaktona. Stablo ove vrste je sivo-tomentozno, gusto obraslo nežlezdanim i žlezdanim dlakama, koje su na vrhu potisnute. Brakteje su veličine 6 – 8 x 1 – 1,5 mm (**Slika 1b**). Cvast je špicasta, čašični listići su jednakih dužina, a krunični su bele boje sa ljubičastim pegama (Ball i Getliffe, 1972).

1.1.2.3. *Nepeta parnassica* Heldr. i Sart.

N. parnassica je višegodišnja zeljasta biljka i endemit je Grčke i južne Albanije. U Grčkoj se nalazi na Peloponezu na planini Helmos i u centralnom delu ove zemlje na planini Parnas. *N. parnassica* naseljava suva kamenita staništa, stenovite oblasti i sipare (Gkinis i sar., 2003). Ova vrsta pripada sekciji *Pycnonepeta* Benth. i agregatu *N. sibthorpii* Benth. Od drugih vrsta ovog kompleksa najjasnije se izdvaja po izraženom indumentumu na stablu. Stablo ove vrste je tomentozno i često lepljivo, zbog prisustva mnoštva žlezdanih dlaka. Cvast je špicasta, pri čemu su donji cvetovi međusobno udaljeni. Brakteole su veličine 5 – 10 x 0,5 – 1,5 mm i lanceolatne. Čašični zupci su jednakih dužina. (Ball i Getliffe, 1972). Ovaj takson dominantno produkuje *trans,cis*-nepetalakton (Mišić i sar., 2015).



Slika 2. Prirodne populacije vrsta roda *Nepeta*: (a) *N. parnassica* na Parnasu (Grčka) i (b) *N. ernesti-mayeri* na lokalitetu Trpejca (Severna Makedonija). Isprekidanom crvenom linijom je ovičena slika cvasti *N. parnassica*. Izvor: Jasmina Nestorović Živković, privatna kolekcija

1.1.2.4. *N. ernesti-mayeri* Diklić i Nikolić

Vrstu *N. ernesti-mayeri* su prvi put otkrili 1976. godine Nikola Diklić i Vojislav Nikolić na jugozapadu Severne Makedonije. Ova vrsta je stenoendemit Severne Makedonije i njen areal je ograničen na planinu Galičica kod Ohrida. Ova vrsta naseljava stenovite kamenjare na 650–800 metara nadmorske visine. Kao i prethodno opisane vrste, pripada sekciji *Pycnonepeta* Benth. i *N. sibthorpii* Benth. kompleksu. Stablo *N. ernesti-mayeri* je uspravno, visine do 60 cm, u donjem delu slabo obraslo nežlezdanim i gusto prekriveno žlezdanim dlakama, dok je gornji deo tomentozaan i prekriven žlezdanim dlakama. Lisne drške su kratke, a listovi ovalni ili izduženo-ovalni, u osnovi srcasti, i gusto obrasli žlezdanim i nežlezdanim dlakama, 10–28 mm širine i 5–15 mm dužine. Verticilasteri su gusti, brojni, 8–22 mm širine, sa brojnim cvetovima (do 65). Krunica je beličasta sa ljubičastim tačkama. Diklić i Nikolić ističu da se od drugih vrsta kompleksa razlikuje po specifičnim dlakama na stablu, kao i po razlikama u dužini između brakteja i čašica (Diklić i Nikolić, 1977). *N. ernesti-mayeri* dominantno produkuje *cis,trans*-NL (Mišić i sar., 2015).

1.1.2.5. *Nepeta sibirica* L.

Nepeta sibirica L. je među najrasprostranjenijim biljkama područja centralne Azije, Mongolije i južnog Sibira, ali je i endemit ovih oblasti (Letchamo i sar., 2005). Ova vrsta raste u aridnim zonama, na travnatim livadama, stepskim travnjacima, strmim kamenitim staništima, pored rečnih dolina i obala jezera. *N. sibirica* je višegodišnja zeljasta vrsta i formira veći broj izdanaka dužine 40 cm. Kod ove vrste potpuno ili gotovo potpuno izostaju nežlezdane dlake. Listovi *N. sibirica* imaju kratke lisne drške, lanceolatnog su oblika, imaju izraženu nervaturu i dostižu dužinu 5 – 15 cm. Brakteje su zašiljene i linearne, mnogo kraće od čašica. Cvasti ovog taksona se sastoje od trouglastih čašičnih listića sa zašiljenim vrhovima i veličine 9 – 14 mm, dok su krunični listići tamnoplave boje i veličine do 3,5 cm (Shu, 1994). *N. sibirica* pripada sekciji *Macronepeta* Benth., a u etarskom ulju ove vrste se pretežno nalazi *cis,trans*-nepetalakton.



Slika 3. *N. nervosa* (a) i *N. sibirica* (b) u staklenoj bašti Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Izvor: Jasmina Nestorović Živković, privatna kolekcija. Slika cvasti vrste *N. sibirica* preuzeta sa sajta: <https://www.claireaustin-hardyplants.co.uk/products/nepeta-sibirica>

1.1.2.6. *Nepeta nervosa* Royle ex Benth.

N. nervosa Royle ex Benth. je višegodišnja zeljasta biljka endemična za Himalaje Kašmira, odnosno za Indiju i Pakistan. Ova vrsta raste u subalpijskim i alpijskim travnjacima, na osunčanim ili delimično zasenčenim prostorima na nadmorskoj visini od 2300 do 3500 metara (Hassan i sar., 2011). *N. nervosa* je dobila svoje botaničko ime zahvaljujući izraženim lisnim nervima. Visina stabla je 30–70 cm, a ono je četvrtasto, slabo granato i uspravno ili blago povijeno. Lisne drške nema ili je veoma kratka, a listovi su lanceolatni dužine 5 – 9 i širine 0,8 – 1,6 cm, zelene boje ili sive na abaksijalnoj strani, celi ili plitko nazubljeni i nemaju dlaka. Cvasti su kratke ili izdužene, cilindrične, dimenzija 2 – 7,1 × 1,5 – 3 cm. Spoljašnje brakteje su ljubičasto-plave, dužine 6 – 10 mm, duže od čašice i lanceolatne, dok su unutrašnje linearne, cilijate i dužine čašice. Cvetovi su sesilni, a krunica plava i dužine 1,5 cm. *N. nervosa* cveta u periodu od jula do septembra, a formira plodove od avgusta do oktobra (Hassan i sar., 2011). Ova vrsta pripada sekciji *Spicata* (Benth.) Pojark. i ne sintetiše nepetalakton ili ga proizvodi samo u tragovima.

1.2. Specijalizovani metabolizam biljaka i njegov ekološki i komercijalni značaj

Živi organizmi su centri intenzivnih i kompleksnih biohemijskih i biofizičkih aktivnosti. Njihov rast, razvoj, kretanje i reproduktivne aktivnosti su rezultat organizovanih i složenih hemijskih promena, koje se jednim imenom nazivaju metabolizmom. U osnovi metabolizma razlikuju se procesi biosinteze i stvaranja molekula (anabolizam) i razgradnje postojećih u cilju formiranja novih molekula ili oslobađanja energije za nove procese (katabolizam). Život biljaka podrazumeva niz usklađenih i kontrolisanih procesa anabolizma i katabolizma, u kojima posreduju brojni enzimi kao glavni nosioci metaboličkih aktivnosti.

U tradicionalnoj podeli prema funkciji, metaboličke aktivnosti koje su esencijalne za rast i razvoj biljaka pripadaju primarnom metabolizmu, dok su sekundarnim metabolitima nazivana jedinjenja za koja se smatralo da nemaju direktnog značaja za opstanak biljaka. Iako primarni metaboliti, kao što su šećeri, aminokiseline, masne kiseline i nukleotidi, obezbeđuju veliku količinu energije potrebne za formiranje

sekundarnih metabolita, dugo se verovalo da su sekundarni metaboliti zapravo metabolički otpad biljaka. Danas je, međutim, poznato da biljke koriste ova jedinjenja kao hemijske signale u ekosistemu i kao sredstvo metaboličke odbrane. Naime, oni omogućavaju preživljavanje biljaka u promenljivim uslovima okruženja, tako što ih brane od napada herbivora, infekcije patogena, služe kao atraktanti oprašivača i životinja koje rasejavaju semena, i kao signalni molekuli alelopatije. Generalno, ova jedinjenja se odlikuju ogromnim strukturnim diverzitetom, ograničenošću na određene familije i rodove, kao i velikom interspecijskom i intraspecijskom varijabilnošću (Arimura i Maffei, 2016). Zbog svega ovoga, tradicionalni termin „sekundarni metaboliti” u literaturi se sve češće zamenjuje terminom „specijalizovani metaboliti”, koji će biti korišćen i u ovoj disertaciji.

Od biljnog specijalizovanog metabolizma čovečanstvo ima višestruke koristi, što se ogleda kroz poboljšanje zdravlja (antibiotici, enzimski inhibitori, imunomodulatori, antitumorni agensi, itd.), širenje piramide zdrave ishrane (začini, prirodne boje, nutraceutici), povećanje poljoprivrednih prinosa (biopesticidi) i, najzad, kroz pozitivan uticaj na čitavu ekonomiju društva (Thirumurugan i sar., 2018). Približno 60% poznatih lekova na tržištu poreklom su od specijalizovanih metabolita biljaka ili su bili inspirisani ovim jedinjenjima. Dok u svetu raste potreba za otkrivanjem novih lekova, koju kombinatorijalna hemija ne može da isprati, prednost se daje upravo prirodnim proizvodima. Od preko 390000 poznatih vrsta biljaka samo je mali deo hemijski okarakterisan, što ostavlja prostor za pronalaženje novih ili slabo istraženih biološki aktivnih struktura. Na osnovu biosintetskog porekla specijalizovani metaboliti se dele na tri velike grupe: terpene, fenilpropanoide i poliketide.

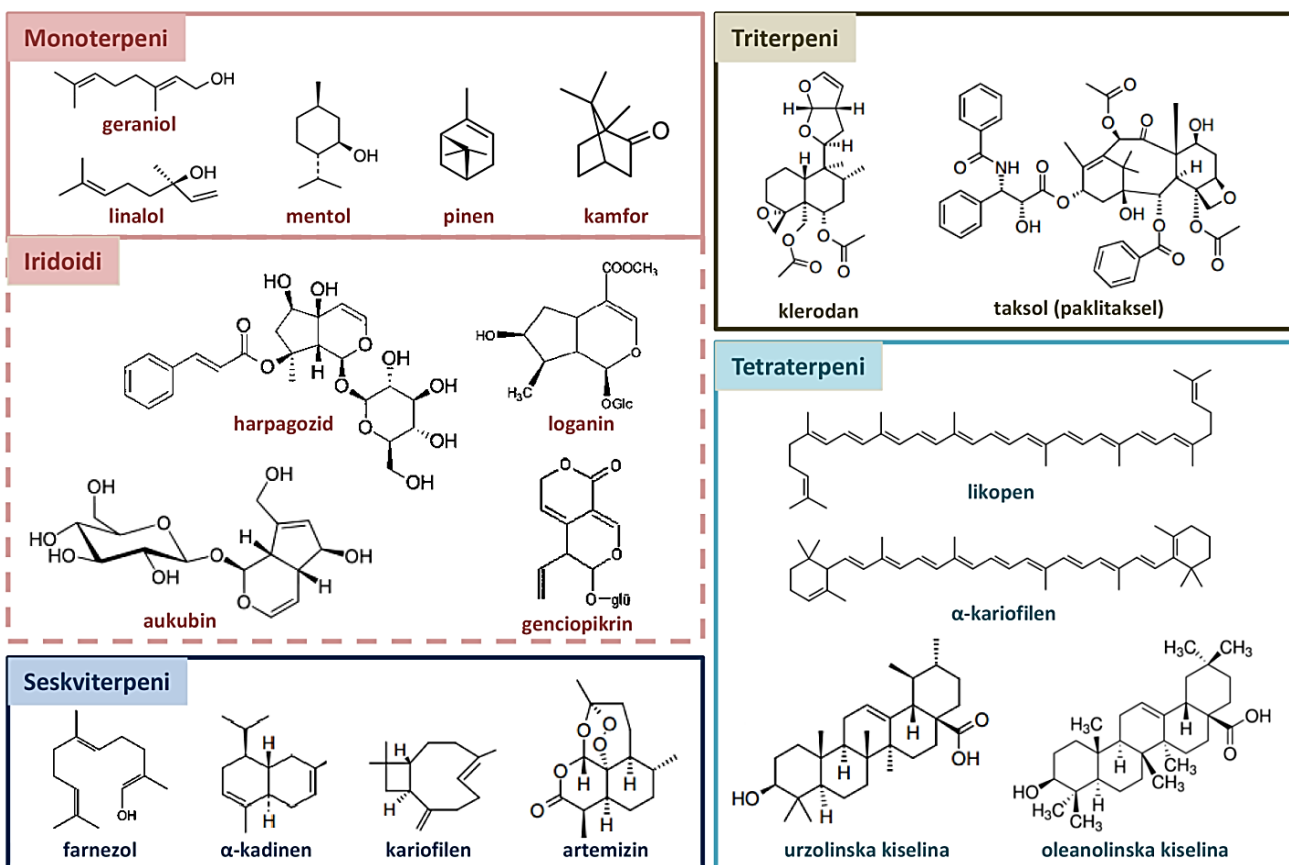
1.2.1. Terpeni i terpenoidi kao specijalizovani metaboliti biljaka

Terpeni čine najbrojniju i strukturno najraznovrsniju grupu specijalizovanih metabolita sa preko 80000 poznatih hemijskih struktura (Christianson i sar., 2017). Neka jedinjenja iz ove grupe deo su primarnog metabolizma biljaka, kao što su steroli, karotenoidi i mnogi hormoni. Najveći broj terpenskih struktura su specijalizovani metaboliti biljaka. Ova jedinjenja su izgrađena od gradivnog izoprenskog bloka, koji se sastoji od pet ugljenikovih atoma. U zavisnosti od broja izoprenskih jedinica od kojih se terpeni sastoje, razlikujemo hemiterpene (1 izopren – C₅) monoterpene (2 izoprena – C₁₀), seskviterpene (3 izoprena – C₁₅), diterpene (4 izoprena – C₂₀), triterpene (6 izoprena – C₃₀), tetraterpene (8 izoprena – C₄₀), itd. Dok su terpeni jednostavni ugljovodonici, terpenoidi (izoprenoidi) su modifikovani terpeni koji sadrže dodatne funkcionalne grupe i oksidovane metilne grupe na različitim pozicijama. Na **Slici 4** prikazane su hemijske strukture predstavnika određenih grupa terpena.

Monoterpeni su glavni konstituenti etarskih ulja velikog broja vrsta i imaju veliki ekonomski značaj, jer se mnogi koriste kao začini i u proizvodnji parfema. Tipični aciklični predstavnici monoterpenoida su geraniol i linalol, dok su među cikličnim najpoznatiji mentol, pinen i biciklični kamfor. Izomeri geraniol i linalol dominantno se sintetišu kod nekih vrsta, kao što su limunova trava (*Cymbopogon citratus*), korijander (*Coriandrum sativum*) i muškatala (*Pelargonium graveolens*). Mentol je poznati metabolit pitome nane (*Mentha piperita*) i drugih vrsta porodice Lamiaceae. α -Pinen je glavni sastojak terpentina i poseduje brojne biološke aktivnosti, među kojima je snažno antimikrobno dejstvo. Kamfor je, zajedno sa 1,8-cineolom, glavno jedinjenje etarskog ulja ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) (Cseke i sar., 2016).

Seskviterpeni su druga velika grupa terpena, koji se često dominantno pronalaze u etarskim uljima velikog broja biljnih vrsta. Najznačajniji predstavnici ove grupe su farnezol, kariofilen iz karanfilića (*Eugenia caryophyllata*) i antimalarijski lek artemizinin iz slatkog pelina (*Artemisia annua*), kao i biljni hormon apscisinska kiselina. Ovoj grupi pripadaju i kadineni koje sintetišu kleka i kedar. Diterpeni se zbog visoke tačke ključanja ne smatraju delom etarskih ulja, već su sastavni deo smole koja ostaje nakon destilacije biljnih ekstrakata. Takav je repelent klerodan iz vrsta *Ajuga*, *Salvia* i *Teucrium*,

kao i citostatik alkaloidni diterpen taksol (paklitaksel) iz roda *Taxus*. Ovde spadaju i biljni hormoni giberelin i giberelinska kiselina. Poznati triterpeni su steroli i saponini, kao i urzolinska i oleanolinska kiselina koje su deo voštane zaštite listova i plodova nekih biljaka. Najznačajniji tetraterpeni su pigmenti karotenoidi. Posebnu grupu terpenoida čine iridoidi, koji strukturno pripadaju monoterpenoidima, a odlikuje ih šestočlani prsten sa atomom kiseonika koji je spojen sa ciklopentanskim prstenom (Cseke i sar., 2016). Gotovo pedeset različitih familija biljaka sintetiše iridoide. Ova jedinjenja se kod biljaka često nalaze u obliku glikozida. Među iridoidima se razlikuju iridoidni glikozidi (npr. akubin, harpagozid, loganin), neglikozilovani ili jednostavni iridoidi (nepetalakton, dehidronepetalakton, dihidronepetalakton), sekoiridoidi (sekologanin, genciopikrin, svercijamarin, sverozid) i bisiridoidi – dimeri iridoida (npr. nepetanudon i nepetaparnon) i sekoiridoida. Predmet istraživanja ove disertacije je metabolizam iridoidnih aglikona kod vrsta roda *Nepeta* i zbog toga se sledeće poglavlje fokusira na nepetalaktone.

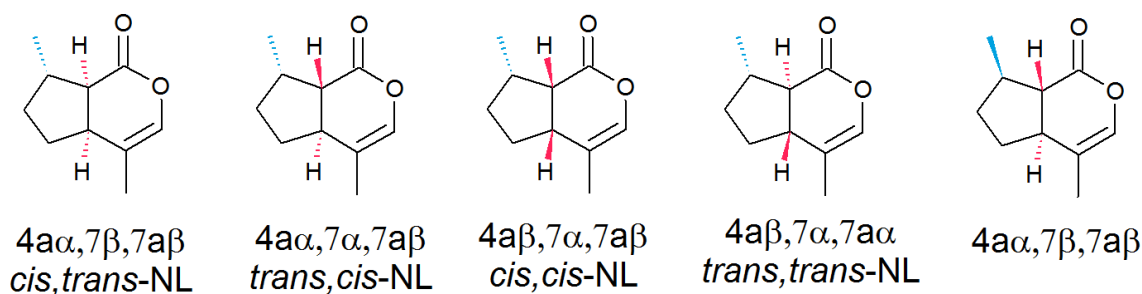


Slika 4. Strukture predstavnika različitih grupa terpena

1.2.2. Nepetalakton – karakteristike, derivati i ekološka uloga

Nepetalakton (hemijski naziv (IUPAC): 4,7-dimethyl-5,6,7,7a-tetrahydro-4aH-cyclopenta[c]pyran-1-one) je iridoidni monoterpenoid izgrađen od ciklopentanoidnog prstena i cikličnog estra (McElvain i sar., 1941). Za razliku od većine iridoida koji se proizvode u prirodi, nepetalakton (NL) je lako isparljivo jedinjenje. U biljnom carstvu, ovaj monoterpenoid dominantno sintetišu samo vrste roda *Nepeta*, po kom je i dobilo naziv. Rod *Nepeta* je prepoznatljiv po halucinogenom dejstvu koji neke vrste ovog roda imaju na vrste porodice mačaka (Felidae), a koji se upravo pripisuje nepetalaktonu. Prvi

put se u literaturi NL spominje 1941. godine, kada ga je Mekelven sa saradnicima identifikovao u etarskom ulju vrste *Nepeta cataria* (McElvain i sar., 1941). Iako se NL dominantno sintetiše kod većine, interesantno je da ga neke vrste roda *Nepeta* proizvode samo u tragovima, ili ga uopšte ne proizvode. S druge strane, kod vrsta koje ga sintetišu, nepetalakton može da se javi u vidu četiri različita diastereoizomera sa 7*S* konfiguracijom (Liblikas i sar., 2005), od kojih se uglavnom samo jedan proizvodi dominantno (Slika 5.). Zbog svega toga, nepetalakton se smatra dobrim hemotaksonomskim markerom vrsta roda *Nepeta* (Mišić i sar., 2015). Prema klasifikaciji Liblikas i saradnika (2005), koje ćemo se pridržavati u ovoj disertaciji, razlikuju se *cis,trans*-NL (4α,7α,7α), *trans,cis*-NL (4α,7α,7β), *cis,cis*-NL (4β,7α,7β) i *trans,trans*-NL (4β,7α,7α). Prvi deo imena se odnosi na konfiguraciju 4a-7a na spoju prstena, dok je drugi deo konfiguracija 7a-7 veze (Liblikas i sar., 2005). Do sada je pronađena *R* konfiguracija na 7 C-atomu samo kod vrste *Nepeta elliptica* (Bottini i sar., 1987) (Slika 5.). U prirodi se nepetalakton može pronaći u vidu osam različitih stereoizomera, četiri diastereoizomera i njihovih enantiomera (Formisano i sar., 2011, Mišić i sar., 2015). Zanimljivo je da je razlika u poziciji samo jedne vodonične veze odgovorna za ispoljavanje različitih bioloških aktivnosti diastereoizomera.



Slika 5. Stereoizomeri nepetalaktona koji su pronađeni u vrstama roda *Nepeta*

Iz tkiva vrsta roda *Nepeta* pored nepetalaktona izolovani su i identifikovani i derivati ovog jedinjenja. U sintezi tih derivata, nepetalakton može proći kroz brojne modifikacione reakcije, kao što su alkilacija, hidroksilacija, oksidacija, redukcija, dekarboksilacija i dehidrogenizacija. Proizvod oksidacije ili dehidrogenizacije nepetalaktona (*Bicchi* i sar., 1984, *De Pooter* i sar., 1988, *Reverchon* i *Rubilli*, 1997), 5,9-dehidronepetalakton (5,9-DNL), prvi put je opisao *Regnier* (*Regnier*, 1967) kao ciklopentanski monoterpenoid nepetalaktonskog tipa sa dve C=C veze. DNL je prvi put izolovan iz ekstrakata *N. cataria* (*Sastry* i sar., 1972), a kasnije je identifikovan i u etarskim uljima drugih vrsta, uključujući *N. nepetella* (*Bicchi* i sar., 1984), *N. nuda* (*Handjieva* i sar, 1996, *Kökdil* i sar., 1998), *N. teydea* (*Velasco-Negueruela* i sar., 1989) i *N. tuberosa* L subsp. *tuberosa* (*Cotrim* i sar., 1994). Nedavno je DNL otkriven i u metanolnim ekstraktima vrsta *N. rtanjensis*, *N. argolica* subsp. *argolica*, *N. parnassica*, *N. ernesti-mayeri*, *N. cataria*, *N. mussinii* i *N. faassenii* (Mišić i sar., 2015). Osim DNL, derivati nepetalaktona koji su otkriveni kod nekih vrsta roda *Nepeta* su i dihidronepetalakton, nepetanudon, parnapimarol i nepetaparnon (*Gkinis* i sar., 2008; *Kökdil* i sar., 1998).

Fiziološka i ekološka funkcija nepetalaktona u vrstama roda *Nepeta* je još uvek nedovoljno istražena. Zna se da isparljiva organska jedinjenja, kao što su monoterpeni, mogu da zaštite fotosintetski aparat od visokih temperatura (*Copolovici* i sar., 2005), ili čak da pomognu u zaštiti čitavog ekosistema regulisanjem atmosferskih hemijskih procesa – dinamike ozona, produkcije ugljen-monoksida i oksidacije metana (*Peñuelas* i *Llusià*, 2003). Pored spomenutih vrsta roda *Nepeta*, nepetalakton proizvode i oslobađaju i neki insekti iz grupe biljnih vaši (Aphidae) u vidu seksualnih feromona (*Pickett* i sar, 2013), kao i vrsta *Graeffea crouanii* (Phasmatidae), kod koje ima ulogu odbrambene supstance (*Smith* i sar., 1979). Kako su ciklopentanoidni monoterpenoidi i njihovi glikozidi repelenti velikog broja

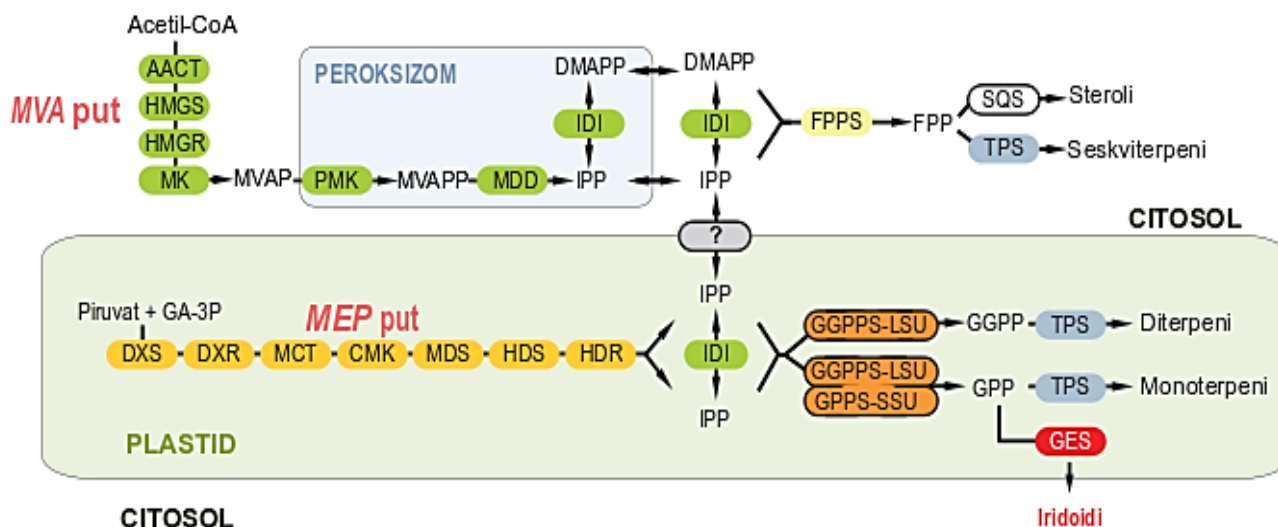
insekata, sinteza ovih jedinjenja u biljkama i insektima može predstavljati zajedničku strategiju u odbrani od napadača – herbivora ili predatora (Hallahan, 2000). Takođe, interesantno je da neke biljke i biljne vaši proizvode identične stereoizomere nepetalaktona (Lorenz i sar., 1993, Birkett i Pickett, 2003), što povećava mogućnost interspecijskog hemijskog ometanja (Beran i sar., 2019). Primera radi, 4a*S*,7*S*,7a*R*-nepetalakton proizvode neke vrste roda *Nepeta*, kao i afide roda *Sitobion* i *Brevicoryne* (Birkett i Pickett, 2003), zbog čega se pretpostavlja da oslobađanjem ovih jedinjenja biljke mogu da ometaju komunikaciju među vašima i spreče napad na biljku (Beran i sar., 2019). Očekuje se da će buduća istraživanja u domenu komunikacije između biljaka i insekata pružiti objašnjenja funkcije nepetalaktona kod biljaka roda *Nepeta*. S druge strane, oslobađanjem nepetalaktona sa površine listova u atmosferu, vrste roda *Nepeta* ne uspostavljaju hemijsku komunikaciju samo sa insektima, već i sa biljkama drugih vrsta u svom okruženju. Veliki broj istraživanja je potvrdio fitotoksično i alelopatsko dejstvo nepetalaktona na različite biljne vrste (pregledni rad Formisano i sar., 2011, Dmitrović i sar., 2015., 2019, Nestorović Živković i sar., 2016), zbog čega se može pretpostaviti da je još jedna uloga ovog jedinjenja da poveća kompetitivnost vrsta roda *Nepeta* u kompleksnim ekosistemima.

1.2.3. Biosintetski put terpena

Kao što je prikazano na **Slici 6.**, terpeni nastaju kondenzacijom univerzalnog prekursora izopentenil-difosfata (IPP) i njegovog acikličnog izomera dimetilalil-difosfata (DMAPP). Kod viših biljaka ova dva jedinjenja su proizvodi dva nezavisna biosintetska puta, koji se odvijaju u dve zasebne unutarćelijske jedinice. IPP se formira u citosolu kroz mevalonatni biosintetski put (MVA), koji počinje kondenzacijom molekula acetil-CoA (Lynen, 1967). Tri molekula acetil-CoA formiraju 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) u reakciji koju katalizuju acetil-CoA acetiltransferaza (AACT) i 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A sintaza (HMGS). Zatim se derivat CoA redukuje do mevalonata pomoću HMG-CoA reduktaze (HMGR). U sledećim koracima, mevalonat prolazi kroz dvostruku fosforilaciju, a zatim i dekarboksilaciju, što za rezultat ima nastanak IPP. Potom, u reakciji koju katalizuje IPP izomeraza (IDI), odvija se konverzija IPP do njegovog izomera – DMAPP. Iako se generalno MVA put vezuje za citosol, skorašnja istraživanja upućuju na to da se poslednji koraci sinteze IPP odvijaju i u peroksizomima (Simkin i sar., 2011, Guirimand i sar., 2012) (**Slika 6.**).

Dugo se pretpostavljalo da je MVA put jedini izvor IPP i DMAPP u produkciji terpena kod svih organizama. Međutim, Lihtentaler (*Lichtenthaler*) je 1999. godine otkrio alternativni biosintetski put, koji se odvija u plastidima i proizvodi IPP i DMAPP nezavisno od MVA, a koji je nazvan metileritriol fosfatni (MEP) put (**Slika 6.**). Početni korak MEP puta je formiranje 1-deoksi-*D*-ksilulozo-5-fosfata (DXP) kondenzacijom piruvata i *D*-gliceraldehid 3-fosfata (GA-3P). Zatim, DXP prolazi kroz redukciju i izomerizaciju pomoću enzima DXP reduktio-izomeraza (DXR) pri čemu nastaje *MEP*. U narednom koraku, MEP i citidin-5'-trifosfat (CTP) konvertuje enzim CDP-ME sintetaza (MCT) do metileritritol citidil difosfata (CDP-ME). ATP-zavisni enzim (CMK) fosforiluje C₂ hidroksilnu grupu CDP-ME, nakon čega rezultujući proizvod – 4-difosfocitidil-2-*C*-metil-*D*-eritritol-2-fosfat (CDP-MEP) prolazi kroz ciklizaciju do 2-*C*-metil-*D*-eritritol-2,4-ciklodifosfata (MEcPP). Sledi reduktivna dehidracija MEcPP i formiranje 4-hidroksi-3-metil-butenil-1-difosfata (HMBPP) u reakciji koju katalizuje 4-hidroksi-3-metilbut-2-enil-difosfat sintaza (HDS). Poslednji korak MEP biosintetskog puta katalizuje HMBPP reduktaza (HDR), čijom aktivnošću nastaju finalni produkti – IPP i DMAPP.

IPP i DMAPP se, zatim, koriste u različitim unutarćelijskim odeljcima kao supstrati kratkolančanih *trans*-prenil transferaza, kako bi formirali veće intermedijere prenil difosfata. Među



Slika 6. Mreža metaboličkih puteva biosinteze terpena kod biljaka (prema *Boachon* i sar., 2018). Skraćenice: acetyl-CoA acetyltransferaza (AACT), 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A sintaza (HMGS); hidroksimetilglutaril-CoA reduktaza (HMGR); ATP:mevalonat-fosfotransferaza (MK); mevalonat 5-fosfat (MVAP); fosfomevalonat kinaza (PMK); mevalonat 5-difosfat (MVAPP); mevalonat difosfat dekarboksilaza (MDD); izopentenil difosfat (IPP); izopentenil difosfat delta-izomeraza (IDI); dimetilalil difosfat (DMAPP); geranil transtransferaza (FPPS); farnezil difosfat (FPP); skvalen sintaza (SQS); terpen sintaza (TPS), 1-deoksi-D-ksilulozo-5-fosfat sintaza (DXS); 1-deoksi-D-ksilulozo-5-fosfat reduktioizomeraza (DXR); 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat, citidilil-transferaza (MCT); 4-(citidin 5-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol kinaza (CMK); 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciklodifosfat sintaza (MDS), 4-hidroksi-3-metilbut-2-en-1-il difosfat sintaza (HDS); 1-hidroksi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfat reduktaza (HDR).

njima su geranil difosfat (GPP, C10), farnezil difosfat (FPP, C15) i geranil-geranil difosfat (GGPP, C20), koje kao supstrate koriste terpen sintaze (TPS) (Slika 6.). Prekursor svih monoterpena, GPP, sintetise se u plastidima od jednog DMAPP i jednog IPP molekula, u reakciji koju katalizuje GPP sintaza (GPPS). FPP je rezultat kondenzacije jednog DMAPP i dva IPP molekula i enzim FPP sintaza (FPPS) je odgovoran za njegovu sintezu. FPPS su lokalizovane u citosolu i mitohondrijama i obezbeđuju FPP za sintezu seskviterpena, homoterpena, triterpena, sterola i poliprenola. Enzim GGPP sintaza (GGPPS) u plastidima, mitohondrijama i endoplazmatičnom retikulumu, učestvuje u izgradnji prekursora diterpena, gibereлина, karotenoida, poliprenola, oligoprenola, strigolaktona, kao i fitilnih bočnih lanaca hlorofila, tokoferola i kinona.

Evidentno je da su MVA i MEP biosintetski putevi dve zasebne strategije sinteze izoprenskih jedinica. MEP put je potvrđen kod eubakterija, zelenih algi i viših biljaka, dok je MVA identifikovan kod životinja, biljaka, gljiva i arhea (*Zhao* i sar., 2013). Drugim rečima, vaskularne biljke se izdvajaju kao jedini organizmi, u kojima su prisutna oba puta, pri čemu je MVA ograničen na citosol i peroksizome, dok se MEP put odvija u plastidima. Uprkos tome što su fizički odvojeni, pokazano je da se razmena IPP između dva puta njegove sinteze odvija pod određenim sredinskim uslovima, naročito u pravcu iz plastida ka citosolu, ali je taj protok veoma ograničen (*Laule* i sar., 2003, *Rodriguez* i *Boronat*, 2015). Pretpostavlja se da je biohemijski smisao zadržavanja oba puta i njihove separacije kod biljaka u tome što se obezbeđuje optimalan protok metaboličkih prekursora potrebnih u svakom ćelijskom kompartmentu. Primera radi, za fotosintezu je potrebno mnogo plastidnih izoprenoida, te je hloroplasna kontrola njihove produkcije efikasnija (*Rodriguez* i *Boronat*, 2015). Poznato je da se citosolni IPP koristi u izgradnji farnezil difosfata (FPP), koji je zajednički prekursor seskviterpena i triterpena, kao što su steroli, brasinosteroidi i ubikvinoni. S druge strane, plastidni IPP je prekursor GPP i GGPP, koji učestvuju u izgradnji monoterpena, diterpena i tetraterpena.

1.2.4. Biosinteza nepetalaktona

Put biosinteze nepetalaktona još uvek nije u potpunosti rasvetljen na molekularnom nivou, mada su u poslednje tri godine objavljena značajna saznanja o završnim koracima ovog biosintetskog puta. Kada je u pitanju početni deo biosinteze NL, smisleno je pretpostaviti da se on ne razlikuje od osnovnog iridoidnog puta, koji je u potpunosti rasvetljen kod vrste *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) (**Slika 7a.**). Ova vrsta proizvodi iridoidni glukozid sekologanin i njegove derivate – terpenoidne indol alkaloidne (TIA) kao što su vinblastin i vinkristin. Rezultati eksperimenta sa dodavanjem obeležene [1-¹³C]-glukoze u medijum kulture ćelija u suspenziji *C. roseus* i analizom ¹³C-NMR podataka, pokazano je da su izotopi ugljenika ugrađeni u sekologanin tipični za plastidni MEP put (*Contin* i sar., 1998). Enzim GPPS, koji katalizuje kondenzaciju DMAPP i IPP i gradi C₁₀ monoterpensku osnovu, imunolokalizovan je u plastidima listova *A. thaliana* (*Bowier* i sar., 2000) i *C. roseus* (*Thabet* i sar., 2011). Uzevši u obzir sva prethodna saznanja kod vrsta bogatih iridoidima, može se pretpostaviti da je inicijalni biogeni prekursor nepetalaktona plastidni IPP proizveden preko MEP biosintetskog puta.

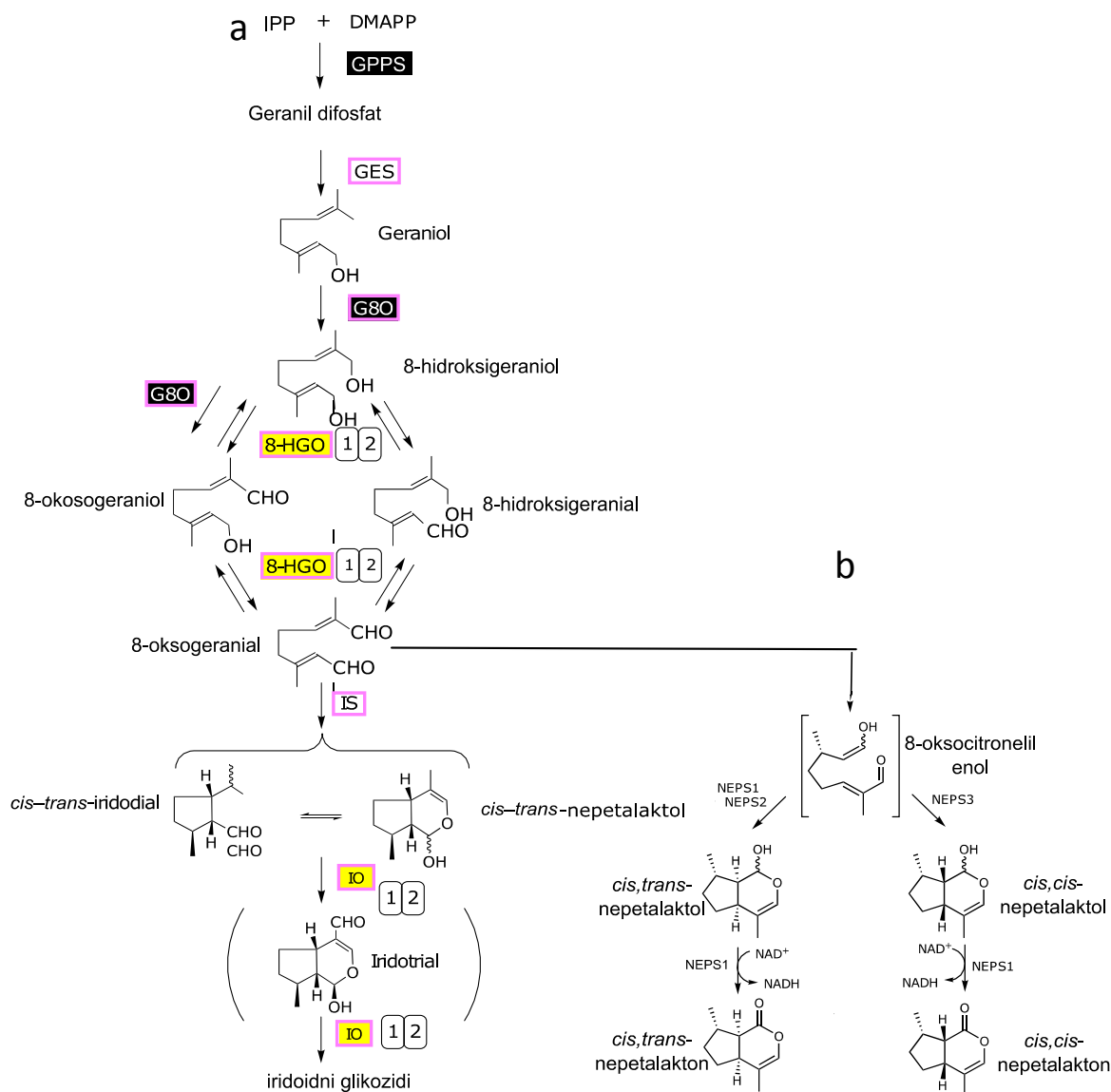
U sledećem koraku biosintetskog puta dolazi do uklanjanja pirofosfatne grupe iz GPP, što katalizuje enzim geraniol sintaza (GES) (*Iijima* i sar., 2004). Enzim GES je prvi put izolovan iz žlezdanih dlaka bosiljka (*Ocimum basilicum*) (*Iijima* i sar., 2004), a od tada je okarakterisan i kod drugih vrsta porodice Lamiaceae, kao što su *Perilla citriodora* i *Perilla frutescens* (*Ito* i *Honda*, 2007), ali i kod *C. roseus* (*Simkin* i sar., 2013). Za GES je pokazano da poseduje sličan katalitički mehanizam kao i druge terpen sintaze, kod kojih se reakcija odvija kroz dodavanje hidroksilne grupe na intermedijernu karbokaciju, umesto hidrolize fosfo-estarske veze (*Iijima* i sar., 2004).

U nastavku, geraniol se hidroksilizuje na C₁₀ poziciji aktivnošću enzima geraniol-10-hidroksilaze/geraniol-8-oksidge (G10H/G8O), koji pripada superporodici citohrom P450 (CYP) monooksigenaza (*Collu* i sar., 2001). Ovaj enzim predstavlja jedan od retkih primera CYP vezanih za endoplazmatični retikulum, koji je do tada uspešno izolovan i prečišćen, što je bilo značajno za parcijalno inicijalno otkrivanje aminokiselinske sekvence (*Collu* i sar., 2004). Enzim G8O je prečišćen iz kulture ćelija *C. roseus*, kod kojih je primećeno da je ekspresija gena koji kodira za ovaj enzim bila povećana dodavanjem biljnog hormona metil jasmonata u supstrat (*Collu* i sar., 2004).

Enzim 8-hidroksigeraniol-oksidge (8HGO) oksidge aciklični monoterpenski alkohol, 8-hidroksigeraniol, do 8-oksogeraniala, koji je zajednički prekursor svih iridoida. Ovaj enzim je prvi put izolovan iz kulture ćelija u suspenziji vrste *Rauwolfia serpentina* (Apocynaceae) (*Ikeda* i sar., 1991). Nakon toga, enzim koji ima funkciju ekvivalentnu 8HGO je identifikovan i kod vrste *Nepeta racemosa* i pokazano je da kao supstrat može koristiti geraniol, nerol, citronelol, kao i njihove hidroksilovane derivate (*Hallahan* i sar., 1995). Potvrda aktivnosti 8HGO u listovima *N. racemosa*, dodatno je učvrstila hipotezu o sintezi nepetalaktona kroz generalni iridoidni put. Kasnije je 8HGO identifikovan i kod *C. roseus* (*Miettinen* i sar., 2014, *Krithika* i sar., 2015). Aktivnost enzima 8HGO dovodi do formiranja 8-oksogeraniala, koji je dialdehidni monoterpenski supstrat za formiranje cikličnih monoterpenskih iridoida.

Sledeći korak biosinteze katalizuje enzim iridoid sintaza (IS), koji je prvi put izolovan iz vrste *C. roseus* i opisan kao redukciona ciklaza. Ovaj enzim konvertuje 8-oksogeranial do *cis,trans*-nepetalaktola i *cis,trans*-iridoidiala koji se nalaze u ekvilibrijumu (*Geu-Flores* i sar., 2012). Gen koji kodira za CrIS identifikovan je u transkriptomskoj bazi *C. roseus* na osnovu sličnosti u obrascu ekspresije sa drugim genima koji učestvuju u biosintezi sekologanina (*Geu-Flores* i sar., 2012). Analiza aminokiselinske sekvence IS otkrila je visok procenat sličnosti sa poznatim progesteron-5 β -reduktazama, koje pripadaju porodici kratkolančanih reduktaza. Osim toga, aktivnost enzima IS zahteva kofaktor NADPH, što dodatno potvrđuje njegovu pripadnost kratkolančanim reduktazama. Nakon što je funkcionalno okarakterisana u *C. roseus*, iridoid sintaza je identifikovana i u drugim vrstama koje proizvode iridoide,

kao što su *Olea europea* (Alagna i sar., 2016), *Antirrhinum majus* (Kries i sar., 2017), *Swertia mussotti* (Xiang i sar., 2017), *Plantago major* (Fellows i sar., 2018), a nedavno i u *Nepeta cataria* i *N. mussinii* (Sherden i sar. 2017).



Slika 7. Pretpostavljeni biosintetski put nepetalaktona preko iridoidnog puta. (a) Generalni iridoidni put u *Catharanthus roseus* (preuzeto iz Miettinen i sar., 2014), (b) Aktivnosti iridoid sintaze (IS) i nepetalaktolu-bliske kratkolančane dehidrogeneze/reduktaze (NEPS) i završni koraci sinteze nepetalaktona u *Nepeta mussinii* prema Lichman i sar., 2019.

Tek nedavno je otkriveno da su kod vrsta roda *Nepeta* redukcija i ciklizacija 8-oksogeranijala dve odvojene reakcije i da iridoid sintaze posreduju samo u njegovoj redukciji (Lichman i sar., 2019a, 2019b). Nakon formiranja acikličnog reaktivnog enolata putem redukcije, IS ne katalizuje njegovu ciklizaciju, već se enolat oslobađa kao proizvod reakcije (Slika 7b.). Ovi rezultati ukazuju na to da se u uslovima *in vitro* reakcije ciklizacija odvija spontano u rastvaraču, u kom se pufer ponaša kao kiseli katalizator

(Lichman i sar., 2019b). Poslednji korak sinteze nepetalaktona zapravo vrši NAD-zavisan enzim koji je nazvan kratkolančana-dehidrogenaza/reduktaza vezana za nepetalaktol, skraćeno NEPS (eng. *nepetalactol-related-short-chain-dehydrogenase/reductase*, NEPS), koji je specifičan za rod *Nepeta* (Lichman i sar., 2019a). Za sada jedini poznati enzimi koji konvertuju nepetalaktol u nepetalakton su NEPS1. Enzimi koji posreduju u formiranju dehidronepetalaktona i drugih derivata nepetalaktona su još uvek nepoznati.

1.2.5. Kratkolančane dehidrogenaze/reduktaze i njihova uloga u biosintezi nepetalaktona

Superporodicu kratkolančanih dehidrogenaza/reduktaza (eng. *short-chain dehydrogenases/reductases*, SDR) čine NAD⁺ ili NAD(P)H zavisni enzimi, koji imaju važne uloge kako u primarnom, tako i u specijalizovanom metabolizmu. Grupa gena koja kodira za ove enzime pripada familiji *VEP1* (*Vein Pattering 1*), koji sadrže Rozmanov sklop kao vezujući domen dinukleotida. Pretpostavlja se da su *VEP1* poreklom od α -proteobakterija, a biljke su ih verovatno stekle latelarnim genskim transferom preko mreža ekoloških interakcija (Tarrio i sar., 2011). U okviru porodice SDR nalaze se enzimi progesteron-5- β -reduktaze ($P5\beta R$), koji enantioselektivno konvertuju progesteron do 5 β -pregnan-3,20-diona, prekursora u biosintezi kardenolida. Ranija istraživanja potvrdila su prisustvo gena $P5\beta R$ u transkriptomima vrsta koje proizvode kardenolide (npr. *Digitalis lanata*), ali i u onim biljkama koje ova jedinjenja ne sintetišu (npr. *A. thaliana*), pri čemu su neki od njih i funkcionalno okarakterisani (Thorn i sar., 2008, Burda i sar., 2009). Široka rasprostranjenost gena $P5\beta R$ u bazama transkriptoma preko 100 vrsta, kao i pokazano „promiskuitetno” vezivanje $P5\beta R$ za različite supstrate, doveli su do pretpostavke da su ovi geni pogrešno anotirani i da enzimi za koje oni kodiraju posreduju i u drugim biosintetskim putevima (Bauer i sar., 2010, Munkert i sar., 2015). U prilog tome, potvrđeno je da homolog $P5\beta R$, izolovan iz vrste *C. roseus*, učestvuje u biosintezi sekoiridoida. Pokazano je da ovaj enzim katalizuje prvi zajednički korak u biosintezi svih iridoida, formira skelet iridana konverzijom 8-oksogeraniala u ekvilibrijum nepetalaktola i iridodiala, i nazvan je iridoid sintaza (IS) (*Geu-Flores* i sar., 2012). CrIS je definisan kao redukciona ciklaza, koja vrši 1,4-adiciju i redukciju linearnog 8-oksogeranijala u prisustvu NAD(P)H, nakon čega sledi formiranje enolnog intermedijera i ciklizacija Dies-Alder-ovom cikloadicijom ili Majklovom adicijom (Kries i sar., 2016). Osim CrIS (*CrP5 β R5*), otkriveno je još četiri paralogih genskih sekvenci kod *C. roseus* (*CrP5 β R1*, *CrP5 β R2*, *CrP5 β R4* i *CrP5 β R6*), za čije je rekombinantne proteine u esejima *in vitro* pokazano da redukuju i progesteron i 8-oksogeranial. Nakon potvrde da $P5\beta R$ iz *C. roseus* ne mogu funkcionalno da se razgraniče, Petersen sa saradnicima (2015.) zaključuje da ova grupa enzima treba da nosi novi naziv „PRISE”, što je akronim od engleskog naziva za enzime sa aktivnošću progesteron-5 β -reduktaze i/ili iridoid sintaze (eng. *progesterone-5 β -reductase and/or iridoid synthase displaying enzymes*).

Aktivnost iridoid sintaze kod „PRISE” enzima svojstvena je cvetnicama i razvila se rano u evoluciji, dok je funkcija $P5\beta R$ evidentno evolutivno starija, jer su funkcionalne $P5\beta R$ otkrivene i kod golosemenica (Rudolph i sar., 2016). Nakon što je prvi put otkrivena CrIS u *C. roseus* (*Geu-Flores* i sar., 2012), iridoid sintaze su funkcionalno okarakterisane u različitim vrstama koje proizvode iridoide (Alagna i sar., 2016; Kries i sar., 2017; Xiang i sar., 2017), a nedavno i u *Nepeta cataria* i *N. mussinii* (Sherden i sar., 2017). Pored progesterona i 8-oksogeranijala, „PRISE” mogu da redukuju i nekoliko 1,4-enona, kao što su 2-cikloheksan-1-on, metil vinil keton (MVK) i citral (Burda i sar., 2009, Schmidt i sar., 2018), za koje se pretpostavlja da su medijatori u odbrambenom signalnom putu. Stoga, smatra se da uloga ovih enzima u biljkama koje ne proizvode ni kardenolide ni iridoide može biti upravo detoksikacija reaktivnih elektrofila sa 1,4-enonskim strukturama.

Superfamiliji SDR pripada i brojna i raznolika grupa *SDR110C*, koju čine NAD-zavisne dehidrogenaze vezane za specijalizovani metabolizam biljaka (Moummou i sar., 2012). Ovoj grupi

pripadaju enzimi NEPS, koji su ciklaze specifične za vrste roda *Nepeta*. Reakcija ciklizacije, koju ovi enzimi katalizuju, predstavlja ne-oksidoreduktivnu [4 + 2] cikloadiciju. Iako je NAD⁺ zavisna oksidoreduktaza izolovana iz listova *N. racemosa* još pre dve decenije (Hallahan i sar., 1998), tek nedavno su iz iste vrste identifikovana i funkcionalno okarakterisana tri enzima, koja kontrolišu stereoselektivno formiranje nepetalaktola. NEPS1 je bifunkcionalna ciklaza i dehidrogenaza, koja formira *cis,trans*-nepetalaktol i oksiduje ga do *cis,trans*-nepetalaktona. Druga izoforma, NEPS2, obavlja samo funkciju *cis,trans*-ciklaze, dok NEPS3 stvara *cis-cis* izomer nepetalaktola.

1.2.6. Transkripciona regulacija glavnog puta biosinteze iridoida

Regulacija biosinteze specijalizovanih metabolita kontrolisana je uglavnom na transkripcionom nivou, koji je generalno zavisna od kombinacije uzajamnog delovanja transkripcionih faktora (TF) i mehanizama vezanih za DNK, kao što su histonske modifikacije i metilacija DNK (Colinas i Goossens, 2018). Transkripcioni faktori su regulatorni proteini, koji se vezuju za DNK i stimulišu ili inhibiraju transkripciju gena, na osnovu čega razlikujemo aktivatore i inhibitore transkripcije (Matić i Savić-Pavićević, 2011). Ekspresija gena kontrolisana je vezivanjem aktivatora ili inhibitora za kratke sekvence regulatornog regiona ciljnog gena, koji se nazivaju *cis*-regulatorni elementi. *Cis*-regulatorni elementi se mogu nalaziti u neposrednoj blizini promotora, ali su češće udaljeni hiljadama nukleotida u okviru regulatornih regiona, koji mogu obuhvatati višestruka mesta vezivanja za aktivatore transkripcije i nazivaju se pojačivači (eng. *enhancers*) (Matić i Savić-Pavićević, 2011). Kako bi TF mogao da reguliše ekspresiju gena, on mora biti smešten u jedru u aktivnom stanju. Posttranslacione modifikacije ili interakcije sa malim molekulima i drugim proteinima aktiviraju, inhibiraju ili degraduju TF (Colinas i Goossens, 2018). Takođe, udaljeni DNK regulatorni element mora biti dovoljno blizu promotoru što se postiže formiranjem hromatinskih omći. Transkripcionu regulaciju ciljnog gena dalje određuju kombinatorijalne aktivnosti većeg broja TF, koji mogu pripadati istoj ili različitim porodicama i oni se mogu vezivati zajednički za isti regulatorni element, biti u kompeticiji za njim, ili njihova kooperativna aktivnost zavisi od vezivanja za različite susedne *cis*-regulatorne elemente. U ovoj kompleksnoj mašineriji, izmena aktivnosti specifične regulatorne komponente dovodi do stvaranja različitih signala, što omogućava fino podešavanje genske ekspresije. Ovo je posebno značajno kako bi promene u biosintezi specijalizovanih metabolita bile usko povezane sa sredinskim promenama ili razvojnim stadijumima biljke.

Aktivnost transkripcionih faktora, odnosno ekspresija gena biosintetskih puteva, zavisi od unutrašnjih signala koje pokreću razvojni procesi, neke anatomske strukture, ali i spoljašnji signali, kao što su uslovi sredine i drugi organizmi (Colinas i Goossens, 2018). Kod svih cvetnica reprogramiranje biosinteze specijalizovanih metabolita započinje signalom odbrambenog fitohormona jasmonata (JA) (Goossens i sar., 2016). Signalna kaskada jasmonata otpočinje bioaktivacijom putem njegovog enzimskog spajanja sa aminokiselinom izoleucinom (Ile). Rezultujući kompleks JA-Ile funkcioniše kao ligand i detektuje ga F-boks protein COI1 (eng. *Coronatine-insensitive 1*, COI1). Nakon toga, Skp-Cullin-Fbox proteinski kompleks (SCF kompleks), koji sadrži COI1 (SCF^{COI1}) olakšava degradaciju transkripcionog represora JAZ proteina (eng. *Jasmonate-ZIM domain*) preko ubikvitin-26S-proteazomskog puta. Dalje, signalna kaskada posredovana jasmonatom uglavnom dovodi do aktiviranja centralnog regulatora TF MYC2 (od kolokvijanog naziva za *A. thaliana* na engleskom – *Mouse-ear cress 2*, MYC2), koji indukuje ekspresiju brojnih signalnih gena, odnosno gena specijalizovanog metabolizma ili nizvodnih TF u signalnom putu (Kazan i Manners, 2013, Colinas i Goossens, 2018). Kod vrste *C. roseus* MYC2 reguliše ekspresiju ORCA (eng. *octadecanoid-derivative responsive Catharanthus AP2-domain*, ORCA) transkripcionih faktora direktnim vezivanjem za „prekidač” u okviru promotera ORCA3 gena i, na taj način, kontrolišu ekspresiju nekoliko gena TIA puta biosinteze (De Geyter i sar., 2012,

Zhang i sar., 2011). Transkripcioni faktori iz iste grupe ORCA2, ORCA4 i ORCA5 kod *C. roseus* pozitivno regulišu gene biosintetskog puta TIA, međutim nisu pod kontrolom MYC2, već ih najverovatnije regulišu neki drugi transkripcioni faktor (Liu i sar., 2016, Paul i sar., 2017). Ekspresiju gena početnog dela sekoiridoidnog biosintetskog puta kod *C. roseus* regulišu i TF BIS1 i BIS2 (eng. *BHLH iridoid synthesis*). Na produkciju specijalizovanih metabolita kod vrsta kod kojih su oni akumulirani u zasebnim anatomskim strukturama, kao što su žlezdane dlake, direktno ili indirektno mogu imati uticaja TF, pod čijom kontrolom je razvoj ovih struktura. Tako biosintezu artemizina kod *Artemisia annua* i razvoj žlezdanih dlaka iniciraju TAR1 (eng. *AP2/ERF trichome and artemisinin regulator 1*), HD1 (eng. *Homeodomain protein 1*), kao i TF iz porodice MYB, AaMIXTA i AaMYB1 (Tan i sar., 2015, Shi i sar., 2017, Yan i sar., 2017); dok je nedavno otkriveno da sličnu ulogu kod *Mentha spicata* ima YABBY5 transkripcioni faktor (Wang i sar., 2016). Kada je u pitanju rod *Nepeta* i transkripciona regulacija biosinteze nepetalaktona, još uvek je nepoznato koji transkripcioni faktori i na koji način kontrolišu ove procese. Međutim, imajući u vidu da kopnene biljke imaju veoma konzerviranu signalnu i regulatornu mašineriju, može se pretpostaviti da su opisani transkripcioni faktori bar delom odgovorni za promene u metabolizmu nepetalaktona.

1.3. Glandularni trihomi kao mesta sinteze specijalizovanih metabolita

Blizu 30% vrsta cvetnica razvija na površini listova specifične anatomske strukture – glandularne trihomi sa jedinstvenom ulogom u produkciji i skladištenju specijalizovanih metabolita. Ove strukture razvijaju se od protodermalnih ćelija nakon antiklinalnih i periklinalnih deoba. Budući da su protodermalni izraštaji, glandularni trihomi se javljaju na površini biljnih organa, a naročito su česti na listovima, cvetovima, a ponegde i na semenima (Akimoura i Maffei, 2016). Veličina glandularnih trihoma kreće se od nekoliko mikrometara do nekoliko centimetara i morfologija im je veoma varijabilna (Payne, 1978). Do sada je opisano više od 300 morfoloških tipova glandularnih trihoma (Maffei, 2010). Uprkos velikom morfološkom diverzitetu, mogu se izdvojiti dva glavna tipa glandularnih trihoma. Njihova morfologija je prilagođena tipu jedinjenja koja proizvode, a naročito u odnosu na isparljivost. Neisparljive i često lepljive supstance, kao što su acilni šećeri i neki diterpenoidi, stvaraju se uglavnom u kapitatnim (glavičastim) trihomima (Wagner i sar., 2004). Oni su sačinjeni od bazalne ćelije u epidermisu, drške i glavice. Glavica je loptastog ili ovalnog oblika i sastavljena je od jedne ili više ćelija sa zrnastom citoplazmom i krupnim jedrima. Drška može biti jedno- ili višećelijska, a često sadrži i dosta vakuola i hloroplasta (Petković i sar., 2005). Sekretorne ćelije na vrhu drške direktno izlučuju jedinjenja na površinu dlake (Tissier, 2012). U nekim slučajevima, npr. kod duvana ili divljeg paradajza *Solanum pennellii*, trihomi luče etarsko ulje koje je veoma lepljivo i služi kao zamka za insekte i manje zglavkare (Fobes i sar., 1985). Glandularni trihomi, koji proizvode isparljiva jedinjenja sadrže prostor za skladištenje koji omogućava akumuliranje i zadržavanje ovih supstanci u tečnom stanju, koja se oslobađaju samo nakon oštećenja trihoma. Ovaj prostor može biti smešten ispod kutikule, odnosno između sekretornih ćelija i kutikule. Ovakvi su peltatni trihomi porodice Lamiaceae ili biserijatni trihomi kod porodice Asteraceae (Turner i sar., 2000). Prostor za skladištenje može biti smešten i između sekretornih ćelija, kao kod trihoma paradajza tipa VI ili VII (Bergau i sar., 2015). Peltatni ili štitasti trihomi sastoje se od vrlo kratke drške i glave sastavljene od većeg broja ćelija koje su rozetasto raspoređene i prekrivene zajedničkom kutikulom. Broj ćelija glave se razlikuje kod rodova porodice Lamiaceae (4–12) i služi kao dijagnostički karakter (Petković i sar., 2005).

Mnoga jedinjenja specijalizovanog metabolizma u visokim koncentracijama mogu biti toksična za biljne ćelije koje ih proizvode, pa razvoj žlezdanih dlaka olakšava skladištenje ovih jedinjenja u velikim količinama bez opasnosti po biljku. Istovremeno, budući da su žlezdane dlake izdvojene na površini organa, mikroorganizmi i herbivori mogu trenutno doći u kontakt sa njihovim sadržajem. Prema

tome, formiranje žlezdanih dlaka u kojima se jedinjenja proizvode i akumuliraju, predstavlja konstitutivnu strategiju protiv napadača. S druge strane, u duvanu, nikotin i srodna jedinjenja se proizvode u korenu, pa se transportuju do žlezdanih dlaka listova, a kod nekih vrsta kao što je *N. repanda* aciluju se nakon herbivorije. Ovakve modifikacije čine nornikotine mnogo toksičnijim, što predstavlja drugi vid strategije protiv herbivora (Laue i sar., 2000). Nedavno je pokazano da žlezdane dlake paradajza tipa VI vrše fotosintezu, ali da ipak glavni izvor ugljenika potiče od saharoze usvojene iz listova. Svetlosna reakcija fotosinteze u trihomima se koristi da bi se produkovala hemijska energija i redukujuća snaga za proces sinteze metabolita, a ne za fiksaciju CO₂ (Balcke i sar., 2017). Za glandularne trihome porodice Lamiaceae, međutim, poznato je da nisu fotosintetske strukture i da je usvajanje šećera iz listova od presudnog značaja za snabdevanje ugljenikom.

Gustina glandularnih trihoma na listovima je varijabilna i može biti određena genetičkim ili sredinskim faktorima (Walker i Marks, 2000). Klimatski činioci kao što su nedostatak vode, visoka temperatura i visok pritisak mogu da uvećavaju gustinu trihoma (Shibuya i sar., 2016). Takođe, potvrđeno je da gustinu i veličinu glandularnih trihoma može regulisati i jasmonat (Thaler i sar., 2002).

Za razliku od glandularnih, mehanički trihomi su široko rasprostranjeni u biljnom carstvu i javljaju se kod skrivenosemenica, golosemenica, prečica, paprati i mahovina (Schuurink i Tissier, 2019). Mehanički trihomi su odgovorni za balans toplote i razmenu gasova listova, ali imaju i protektivnu ulogu od oštećujućeg ultraljubičastog (UV) zračenja, kao i u regulaciji procesa evapo-transpiracije (Bickford, 2016). Formiranje gustog pokrivača mehaničkih trihoma na površini listova najčešće je vezano za biljke prilagođene aridnim staništima. Kod većeg broja biljaka istovremeno se javljaju različiti tipovi kapitatih, peltatih i mehaničkih trihoma.

Jedna od korisnih činjenica vezanih za strukture u kojima se odvija čitava sinteza određenog jedinjenja jeste ta da je u njima povećan broj transkripata gena koji kodiraju za enzime njegovog biosintetskog puta. Povećan sadržaj različitih učesnika biosintetskih puteva u glandularnim trihomima, na nivou transkripata, ali i na proteinskom nivou, bili su od esencijalnog značaja za rasvetljavanje ovih puteva na molekularnom nivou. Razvoj tehnologija genomike i transkriptomike omogućio je EST (eng. *Expressed Sequence Tag*) *large-scale* sekvenciranje, ali i ekonomičnije sekvenciranje nove generacije – *RNA-Seq* ili *Shotgun sequencing*. Primena sekvenciranja na prečišćenim glandularnim trihomima je generisala kolekciju sekvenci, koje su se pokazale veoma korisnim u identifikaciji i karakterizaciji gena različitih biosintetskih puteva. Ovakvi primeri su brojni, kao što je slučaj rasvetljavanja biosinteze mentola kod *M. piperita*, zatim artemizina kod *A. annua*, fenilpropena u bosiljku i diterpenoida u duvanu. Nedavno je, pretraživanjem proteoma glandularnih trihoma i poređenjem sa proteomom listova sa kojih su one uklonjene, otkriven kandidat za kratkolančanu dehidrogenazu u listovima *N. mussinii*, za koju je potvrđeno da konvertuje nepetalaktol u nepetalakton (Lichman i sar., 2019).

1.4. Abiotički stres i odgovor specijalizovanog metabolizma biljaka

Svako stanište odlikuje se kombinacijom ekoloških faktora, abiotičkih i biotičkih, čija je bitna osobina varijabilnost i heterogenost u vremenu i prostoru (Stevanović i Janković, 2001). Sa stanovišta biljke, kao člana biocenoze tog staništa, ekološki faktori mogu proizvesti optimalne uslove za život, kada je rast i reprodukcija najbolja, a opstanak neugrožen. S druge strane, kada jedan ili više faktora stvaraju nepovoljne (pesimalne) uslove, takve da je rast, reproduktivni kapacitet ili opstanak biljke na tom staništu ugrožen, onda takve uslove definišemo kao stres (Rhodes i Nadolska-Orczyk, 2001). U najčešće abiotičke faktore stresa spadaju temperaturni ekstremi, nedostatak ili višak vode (suša ili poplava), visok salinitet, teški metali, UV zračenje, nedostatak ili višak nutrijenata i ekstremene pH vrednosti zemljišta. Takođe, među abiotičkim stresogenim faktorima nalaze se i oni koji dovode do mehaničkih povreda (npr., vetar, grād, mehanička oštećenja tokom rastenja korena u kompaktnom zemljištu, itd.) (Rhodes i Nadolska-

Orczyk, 2001). Reakcija biljaka na stres uključuje percepciju signala, zatim pokretanje signalne kaskade koja aktivira ili obustavlja različite biohemijske procese, kako bi se proizveo adekvatan odgovor čiji je cilj prevazilaženje efekta stresogenih faktora.

Svaki abiotički stres kod biljaka mora biti percipiran preko receptora specifičnih za taj stres. Danas je poznato veoma malo specifičnih senzora abiotičkog stresa kod biljaka. Nedavno su otkriveni membranski receptori OSCA1 (eng. *reduced hyperosmolarity-induced calcium increase 1*), koji formira kalcijumove kanale pod uticajem osmotskog stresa (Yuan i sar., 2014), i COLD1 (od eng. *Chilling Tolerance Divergence 1*), koji je medijator hladnog stresa (Ma i sar., 2015). Hladni, toplotni i osmotski stres mogu dovesti do promene u fluidnosti ćelijske membrane (Sangwan i sar., 2002), a te promene mogu prepoznati i integralni membranski proteini, uključujući jonske kanale, različite transportere, itd. (Scharft i sar., 2012, Zhu 2016). Nakon percepcije, zajedničko za većinu abiotičkih stresova je povećanje koncentracije Ca^{2+} jona u citosolu. Signalna transdukcija se može odvijati na više načina u zavisnosti od tipa stresa, pa se razlikuju: 1. osmotski signalni put preko mitogenin aktiviranih proteinskih kinaza (MARK), 2. kalcijum-zavisni signalni put koji dovodi do aktivacije DRE/CRT gena (eng. *Dehydration responsive elements/Cold responsive sensitive transcription factors*), 3. kalcijum-zavisni SOS (eng. *salt overlay sensitive*) signalni put, koji dovodi do jonske homeostaze (Gupta i Kaur, 2005, Zhu, 2016). Procesi signalne transdukcije dalje regulišu nastajanje i aktivnost proteina od ključnog značaja za jonski i vodni transport, kao i reprogramiranje metabolizma i genske ekspresije, a u cilju postizanja homeostaze i ćelijske stabilnosti. Abiotički stres koji je od interesa za ovu disertaciju jeste vodni deficit.

1.4.1. Vodni deficit i njegov uticaj na fiziologiju biljaka i produkciju specijalizovanih metabolita

Kada je količina vode koju biljka izgubi transpiracijom veća od one količine koju usvoji iz spoljašnje sredine, dolazi do vodnog deficita, koji utiče na metabolizam čitave biljke, a naročito listova (Nešković i sar., 2004, Stevanović i Janković., 2001). Vodni deficit u biljci može da nastane usled nedostatka vode u podlozi (fizička suša), ili nemogućnosti usvajanja vode koja je u podlozi prisutna (fiziološka suša), kao u slučaju visokog saliniteta zemljišta ili niskih temperatura (Vujičić i sar., 2014). Deficit vode izaziva kompleksne odgovore koji počinju percepcijom stresa, čime se inicira put signalne transdukcije, a ispoljavaju se kroz promene na ćelijskom, fiziološkom i morfološkom nivou. Odgovor biljke na vodni deficit zavisi od genotipa, razvojnog stadijuma, starosti biljke, kao i od količine izgubljene vode i stope gubitka vode, odnosno intenziteta i dužine trajanja nepovoljnih uslova (Bray, 1993, 1997). Fiziološka strategija biljaka u odgovoru na vodni deficit može biti ili izbegavanje ili tolerancija stresa. Strategije se ispoljavaju u vidu konstitutivnih i genotipski determinisanih adaptacija i kroz prilagođavanje jedinke na izmenjene uslove sredine, odnosno aklimatizaciju (Vujičić i sar., 2014).

Prva vidljiva morfološka promena usled vodnog deficita je smanjenje lisne površine, do koje dolazi zbog redukovane ekspanzije ćelija lista. Pri vodnom deficitu turgor ne dostiže maksimalnu moguću vrednost i ćelije ostaju male, što smanjuje i transpiracionu površinu. (Nešković i sar., 2004). Prvi mehanizam zaštite biljaka od daljeg gubitka vode preko transpiracije je zatvaranje stoma, u čemu posreduje apscisinska kiselina (ABA). Ovaj fitohormon ima centralnu ulogu u regulaciji adaptacija na stres u biljnoj ćeliji tokom vodnog deficita. Pored uticaja na reprogramiranje ćelijskih mehanizama u odgovoru na abiotički stres, ABA podstiče i promene u metabolizmu ugljenih hidrata i lipida (Seki i sar., 2002). Signalni transdukcioni sistem ABA sastoji se od proteinskih fosfataza i SnRK2 kinaza, koje indukuju produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i azot-monoksida (NO) (Lee i Luan, 2012). ROS su veoma značajni signalni molekuli stresa u uslovima vodnog deficita, među kojima se posebno izdvaja vodonik-peroksid (H_2O_2) (Neill, 2007, Wang i sar., 2008). Za H_2O_2 pretpostavlja se da ima ulogu u komunikaciji između hloroplasta i jedra (tzv. retrogradna komunikacija) tokom suše i da podstiče

ekspresiju različitih gena (Chan i sar., 2010). U stomalnim ćelijama zatvaračicama H_2O_2 i NO mogu da aktiviraju kalcijumove kanale i inluks Ca^{2+} ; istovremeno se odvija depolarizacija membrane i efluks jona K^+ kroz kalijumove kanale, zbog čega dolazi do zatvaranja stoma (Munemasa i sar., 2015). Zatvaranjem stoma narušava se razmena gasova i ograničava fotosintetska aktivnost ćelija. Smanjeno usvajanje CO_2 prvenstveno suprimira fotohemijsku efikasnost *PSII* smanjenjem elektronskog transporta, zatim aktivnost *Rubisco* proteina, ali i menja odnos hlorofila a/b i karotenoida (Cui i sar., 2019). Ograničavanje fotosinteze, osim nakupljanja *ROS* molekula koji mogu da prouzrokuju oksidativna oštećenja, dovodi do smanjenja sadržaja ugljenih hidrata, koji predstavljaju osnovne gradivne komponente u metabolizmu. Zbog toga se kod velikog broja biljaka tokom dehidratacije razlažu zalihe skroba i povećava se količina saharoze i monosaharida koji obezbeđuju energiju za preživljavanje stresnih uslova. Kako su odbrambeni molekuli, poput terpenoida, bogati ugljenikom, njihova produkcija postaje energetski „skupa” za biljku tokom vodnog stresa (Poorter i Villar, 1997; Langenheim, 2003). Vodni stres srednjeg intenziteta dovodi do redukcije rasta i povećanog ulaganja energije i dostupnog ugljenika u odbrambene mehanizme (Herms i Mattson, 1992, Stamp, 2003, Navarro i sar., 2008). Međutim, vodni stres jačeg intenziteta ili dugog trajanja inhibira sintezu odbrambenih molekula (Coulson, 1979, McDowell, 2011), usled nedostatka nestrukturnih ugljenih hidrata, kao što je skrob (Lewinsohn i sar., 1991, Guérard i sar., 2007). Šta više, tokom dugotrajnog stresa biljke mogu biti primorane da razgrade odbrambene molekule i tako oslobode energiju potrebnu za preživljavanje u uslovima smanjene fotosintetske aktivnosti (McDowell, 2011).

S druge strane, postoji objašnjenje da dugotrajni vodni deficit zapravo stvara biohemijske uslove koji stimulišu produkciju specijalizovanih metabolita. Kako fiksacija CO_2 kroz Kalvinov ciklus dramatično opada pod uticajem vodnog deficita, dolazi do akumulacije redukcionih ekvivalenata ($NADPH^+ + H^+$), koji generišu stvaranje različitih *ROS* (Radwan i sar., 2017). Ovi molekuli bi mogli dovesti do ozbiljnih oštećenja fotosintetskog aparata i, kako bi se to sprečilo, pokreću se različiti zaštitni mehanizmi (fotorespiracija, ciklus ksantofila, formiranje superoksid dismutaza i peroksidaza, itd.) (Selmar i Kleinwächter, 2013). Međutim, i pored svih ovih mehanizama, dehidratacija nastavlja da uzrokuje prekomerno stvaranje i akumulaciju redukcionih elemenata. Zbog toga, neki autori smatraju da snažna redukciona moć može da podstakne sintezu redukovanih jedinjenja, kao što su terpenoidi, fenoli ili alkaloidi (Wilhelm i Selmar, 2011, Selmar i Kleinwächter, 2013). Da stanje prekomerne redukcije usled vodnog deficita, dovodi do povećanja stope biosinteze specijalizovanih metabolita, potvrđeno je kod vrste *Salvia officinalis* (Nowak i sar., 2010). U ovom eksperimentu su biljke *S. officinalis* paralelno gajene u uslovima ambijentalne i povišene koncentracije CO_2 tokom vodnog stresa blagog intenziteta. Kod biljaka gajenih u uslovima povećanog atmosferskog CO_2 došlo je do njegove povišene fiksacije u biljci, zbog čega su sniženi redukcionni elementi, pa se, posledično, smanjila i produkcija monoterpena u uslovima vodnog deficita (Nowak i sar., 2010).

Osim *ABA*, i drugi hormoni učestvuju u regulaciji odgovora biljne ćelije na vodni deficit i njihove signalne mreže imaju uticaj na kontrolu zatvaranja stoma, metabolizam skroba i druge aktivnosti primarnog metabolizma. Jasmonska kiselina (eng. *jasmonate- JA*) i njeni derivati imaju značajnu ulogu u odgovoru biljaka na sušu, tako što mogu inicirati *ABA* signalni put ili stimulisati neki deo tog puta, a naročito je važan njihov uticaj na specijalizovani metabolizam.

1.4.2. Kvantifikacija vodnog deficita i upotreba polietilen glikola (PEG) u eksperimentalnom modelu dehidratacije

U kvantitativnom smislu, vodni deficit se može okarakterisati kao smanjenje vodnog potencijala podloge (Ψ_w). Na osnovu Vant-Hofove (*van't Hoff*) jednačine, to ukazuje na smanjenje slobodne

energije vode u podlozi, što za biljke čini usvajanje ove vode termodinamički nepovoljnim, i verovatno vodi do dehidracije (*Osmolovskaya i sar., 2018*). Vrednosti Ψ_w od 0 do -0,3 MPa su karakteristične za optimalno hidratizane biljke, dok vrednosti od -0,4 MPa do -1,5 MPa odgovaraju vodnom stresu srednjeg intenziteta, a potencijali ispod -2MPa uzrokuju stress jakog intenziteta (*Osmolovskaya i sar., 2018*). Međutim, ove vrednosti variraju između različitih vrsta i zavise od njihove tolerancije na ovaj tip stresa. Dobar pokazatelj vodnih odnosa u biljci, a posredno i intenziteta stresa, je relativni sadržaj vode. Relativni sadržaj vode (eng. *relative water content, RWC*) određuje količinu vode u biljci u odnosu na stanje pune turgescencije (potpune zasićenosti vodom) i izražava se u procentima na osnovu količnika razlika između sveže i suve biomase i turgescencije i suve biomase, a prema jednačini: $RWC = (\text{sveža težina} - \text{suva težina}) / (\text{turgescencijna težina} - \text{suva težina}) \times 100 (\%)$ (*Slayter, 1967*).

Eksperimentalno simuliranje suše dodavanjem osmotski aktivnih supstanci u hranljivu podlogu omogućava precizno praćenje vrednosti vodnog potencijala u podlozi. Slično se dešava u zemljištu kada se količina vode u njemu smanji (usled evaporacije ili usvajanja od strane biljaka) i koncentracija rastvorenih osmotski aktivnih supstanci poraste. Povećanje osmotskog pritiska medijuma u odnosu na biljna tkiva dodavanjem osmolita odgovara događajima koji se odvijaju u prirodi i simulira se suša, pri čemu se stvaraju uslovi fiziološke suše. Ova strategija dozvoljava precizno podešavanje vodnog potencijala i efikasno praćenje njegovog efekta, čime se obezbeđuje velika tačnost, reproduktivnost eksperimenta i uporedljivost sa rezultatima iz sličnih eksperimenata (*Amist i Singh, 2016, Osmolovskaya i sar., 2018*). Međutim, kada se radi sa ovakvim modelima simuliranja suše, neophodno je odabrati adekvatan osmolit. Osmoliti niske molekulske mase (kao što su saharoza ili natrijum-hlorid) usvajaju se preko ćelijskog zida i membrane i mogu dovesti do plazmolize, dok soli mogu i da ometaju jonski transport (*Hohl i Schopfer, 1991, Osmolovskaya i sar., 2018*). S druge strane, ne-jonski ugljeni hidrati, kakvi su sorbitol i manitol, deo su ćelijskog metabolizma i kao takvi mogu uticati na rezultate eksperimenta (*Munns, 2002*), a mogu biti i toksični za biljku (*Verlues i sar., 1998*). Zbog toga, upotreba biološki inertnih polimernih osmolita ima mnogo prednosti, te se eksperimentalni modeli simuliranja suše oslanjaju na upotrebu nepermeabilnog osmolita visoke molekulske mase – polietilen glikola (PEG) čija prosečna molekulska težina iznosi 6000 Da ili više (*Osmolovskaya i sar., 2018, Zhong i sar., 2018*). Zbog svih navedenih prednosti, simuliranje suše zasnovano na PEG-u predstavlja metodu izbora u biljnoj fiziologiji i molekularnoj biologiji (*Rao i sar., 2013*).

1.4.3. Vodni deficit i produkcija trepenoida kod porodice Lamiaceae

Centar porekla većine medicinskih i aromatičnih biljaka iz porodice Lamiaceae je mediteranski basen (*Arimura i Maffei, 2016*). Ove biljke akumuliraju raznovrsne specijalizovane metabolite u svojim etarskim uljima koji su veoma značajni za farmaceutsku i prehrambenu industriju. Mediteranski region odlikuje varijabilni sastav zemljišta i klimatskih uslova (*Heywood, 1995*), međutim opšte karakteristike ovog podneblja podrazumevaju jasno izražen sušni period u toku godine, sa intenzivnom sunčevom radijacijom i visokim temperaturama, kao i suva i kamenita staništa sa malo vodenog taloga (*Janković, 1990*). Vrste iz porodice Lamiaceae su konstitutivno adaptirane na ovakve uslove staništa, što znači da su tokom evolucije izgradile jedinstvene i kompleksne mehanizme tolerancije vodnog deficita. Prirodne varijacije u ovim mehanizmima tolerancije mogu biti od koristi za razvijanje tolerantnijih i produktivnijih useva. Preduslov za to je poznavanje optimalnih sredinskih uslova, koji obezbeđuju maksimalan prinos određenog specijalizovanog metabolita.

U **Tabeli 1.** prikazana su različita dejstva vodnog deficita na sadržaj glavnih terpenkih konstituenata biljaka iz porodice Lamiaceae. Većina analiziranih vrsta u ovim radovima dominantno proizvodi različite monoterpene čija je promena sadržaja praćena u etarskim uljima. Kod nekih vrsta, kao što su *Lavandula angustifolia*, *Salvia fruticosa*, *Mellisa officinalis* i *Salvia officinalis*, pokazano je

da vodni deficit srednjeg ili jakog intenziteta može dovesti do povišenog sadržaja glavnih konstituenata (*Chrysargyris* i sar., 2016; *Manukyan*, 2011; *Radwan* i sar., 2017). Međutim, povišena količina metabolita ne govori obavezno o intenziviranju biosintetske aktivnosti, već ona može biti posledica redukcije u rastu i biomasi usled dehidracije, dok biosinteza ostaje konstantna (*Radwan* i sar., 2017). Zbog toga, kako bi se utvrdio pravi razlog povišenog sadržaja metabolita, neki autori predlažu da bi rezultate trebalo predstaviti u vidu ukupne količine metabolita u biljci, odnosno kao proizvod biomase i koncentracije izražene u odnosu na suhu ili svežu masu (*Selmar* i *Kleinwächter*, 2013). Sadržaj glavnih monoterpena vrsta *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Thymus carmanicus* i *Salvia dolomica* smanjuje se usled vodnog deficita srednjeg ili jakog intenziteta, dok kod vrste *Ocimum basilicum* već blagi vodni deficit značajno snižava sadržaj linalola u listovima (*Simon* i sar., 1992). Kod vrste *Mentha piperita* dominantno se sintetiše menton, čiji sadržaj opada ili se ne menja značajno pod uticajem srednjeg i jakog stresa, dok na količinu mentola dehidracija nema uticaja. Nedostatak vode nema uticaja ni na sadržaj glavnih konstituenata *Origanum vulgare* subsp. *gracile*, *Mellisa officinalis* i *Prunella vulgaris* (*Morshedloo* i sar., 2017., *Nómeth-Zámbori* i sar., 2016 i *Chen* i sar., 2011). Pored različitih dejstava na glavne konstituente, dehidracija uslovljava promenu u odnosima sadržaja monoterpena, kao i ukupnih monoterpena i seskviterpena kod većine vrsta porodice Lamiaceae (*Barbieri* i sar., 2012, *Hassanpour* i sar., 2014, *Morshedloo* i sar., 2017, *Német-Zámbori* i sar., 2016, *Said-Al Ahl* i sar., 2016). Evidentno je da vodni deficit ima različite efekte na akumulaciju dominantnih konstituenata, što govori o tome da se kod vrsta porodice Lamiaceae javljaju specifične strategije u metabolizmu specijalizovanih metabolita, kao deo mehanizama tolerancije vodnog deficita.

Tabela 1. Uticaj vodnog deficita na sadržaj glavnih konstituenata etarskih ulja vrsta iz porodice Lamiaceae

Vrsta	Glavni konstituent	Grupa terpena	Uticaj vodnog deficita na sadržaj	Intenzitet stresa	Reference
<i>Satureja hortensis</i>	karvakol γ -terpinen	monoterpeni	Povišava se Snižava se	Umeren	<i>Baher</i> i sar., 2002
<i>Thymus carmanicus</i>	karvakol	monoterpen	Snižava se	Umeren i jak	<i>Bahreinejad</i> i sar., 2014
<i>Mentha piperita</i>	menton mentofuran	monoterpeni	Snižava se Povišava se	Umeren i jak	<i>Búfalo</i> i sar., 2016
<i>Salvia dolomica</i>	limonen	monoterpen	Snižava se	Umeren i jak	<i>Caser</i> i sar., 2019
<i>Mentha piperita</i>	menton mentol	monotrereni	Snižava se Ne menja se	Umeren i jak	<i>Charles</i> i sar., 1990
<i>Prunella vulgaris</i>	urzolinska i oleanolinska kiselina	triterpeni	Ne menjaju se	Umeren	<i>Chen</i> i sar., 2011
<i>Lavandula angustifolia</i>	1,8-cineol	monoterpen	Povišava se	Umeren i jak	<i>Chrysargyris</i> i sar., 2016
<i>Salvia fruticosa</i>	kamfor	monoterpen	Povišava se	Umeren i jak	<i>Chrysargyris</i> i sar., 2016

<i>Rosmarinus officinalis</i>	kamfor	monoterpen	Snižava se	Umeren	<i>Llusià i sar.</i> , 2006
<i>Ocimum basilicum</i>	linalol	monoterpen	Ne menja se	Umeren i jak	<i>Mandulakani i sar.</i> , 2017
<i>Nepeta cataria var. citriodora</i>	geraniol	monoterpen	Ne menja se	Umeren i jak	<i>Manukyan</i> , 2011
<i>Melissa officinalis</i>	geranijal	monoterpen	Povišava se	Umeren i jak	<i>Manukyan</i> , 2011
<i>Salvia officinalis</i>	α -tujon kamfor	monoterpeni	Snižava se Ne menja se	Umeren i jak	<i>Manukyan</i> , 2011
<i>Origanum vulgare subsp. gracile</i>	karvakol	monoterpen	Ne menja se	Slab i umeren	<i>Morshedloo i sar.</i> , 2017
<i>Origanum vulgare subsp. virens</i>	α -bisalbon	seskviterpen	Povišava se	Umeren	<i>Morshedloo i sar.</i> , 2017
<i>Salvia officinalis</i>	α/β -tujon cineol	monoterpen	Povišava se	Umeren	<i>Radwan i sar.</i> , 2017
<i>Dracocephalum moldavica</i>	geranil acetat	monoterpen	Povišava se	Umeren i jak	<i>Said-Al Ahl i sar.</i> , 2009
<i>Nepeta cataria</i>	nepetalakton	monoterpenoid	Povišava se	Umeren i jak	<i>Said-Al Ahl i sar.</i> , 2016
<i>Nepeta cataria var. citrodora</i>	geraniol	monoterpen	Snižava se	Umeren i jak	<i>Said-Al Ahl i sar.</i> , 2016
<i>Ocimum basilicum</i>	linalol	monoterpen	Snižava se	Slab i umeren	<i>Simon i sar.</i> , 1992
<i>Majorana hortensis</i>	<i>cis</i> -sabinen-hidrat	monoterpen	Snižava se	Jak	<i>Nómeth-Zámbori i sar.</i> , 2016
<i>Melissa officinalis</i>	geranijal	monoterpen	Ne menja se	Jak	<i>Nómeth-Zámbori i sar.</i> , 2016
<i>Mentha piperita</i>	menton mentol	monoterpeni	Ne menjaju se	Jak	<i>Nómeth-Zámbori i sar.</i> , 2016
<i>Thymus vulgaris</i>	Timol	monoterpen	Snižava se	Jak	<i>Nómeth-Zámbori i sar.</i> , 2016

2. Cilj rada

Osnovni ciljevi doktorske disertacije usmereni su ka rasvetljavanju:

- metabolizma nepetalaktona (NL) u listovima odabranih vrsta roda *Nepeta*;
- molekularnih mehanizama regulacije biosinteze NL tokom razvića listova i u uslovima eksperimentalno indukovane dehidracije;
- uloge iridoid sintaze (IS), enzima koji učestvuje u poslednjem koraku biosinteze nepetalaktola, u metabolizmu NL kod vrsta roda *Nepeta*, koje se razlikuju u pogledu kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja nepetalaktona.

Istovremeno, analizirana je biološka aktivnost glavnih iridoidnih i fenolnih konstituenata listova vrsta *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* s ciljem utvrđivanja značaja stereochemije nepetalaktona u ispoljavanju biološke aktivnosti.

Realizacija postavljenih ciljeva obuhvatala je sledeće aktivnosti:

- Pretraga transkriptoma listova *N. rtanjensis* u cilju identifikacije kandidata gena uključenih u biosintetski put nepetalaktona, kao i gena za transkripcione faktore, koji učestvuju u regulaciji biosinteze ovog jedinjenja;
- Lokalizacija mesta biosinteze i akumulacije nepetalaktona u listovima *N. rtanjensis* na nivou tkiva;
- Ispitivanje mehanizama regulacije biosinteze nepetalaktona tokom razvića listova *N. rtanjensis*;
- Analiza uticaja dehidracije izazvane polietilen glikolom (PEG-om) na sadržaj nepetalaktona u listovima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*, kao i na ekspresiju gena kandidata biosintetskog puta nepetalaktona i gena koji kodiraju transkripcione faktore.
- Funkcionalna karakterizacija iridoid sintaza iz listova odabranih vrsta roda *Nepeta* heterologom ekspresijom u bakterijama (*Echerichia coli*), prečišćavanjem rekombinantnih proteina i ispitivanjem njihove aktivnosti u enzimskim esejima *in vitro*.
- Analiza ekspresije iridoid sintaza kod vrsta roda *Nepeta*, koje su bogate nepetalaktonima (*N. rtanjensis* i *N. sibirica*) i kod *N. nervosa*, koja se odlikuje odsustvom merljivih količina iridoidea u tkivima;
- Utvrđivanje biološke aktivnosti (antimikrobne i imunomodulacijske) metanolnih ekstrakata i dominantnih iridoidnih i fenolnih jedinjenja listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*

3. Materijal i metode

3.1. Morfolološka i hemijska karakterizacija listova *N. rtanjensis*

3.1.1. Biljni materijal

U eksperimentima koji su za cilj imali da lokalizuju glavno mesto proizvodnje i akumulacije nepetalaktona kod vrste *N. rtanjensis*, korišćene su jedinke odgajane na eksperimentalnoj parceli Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. U drugoj vegetacionoj sezoni, u martu 2014. godine, sakupljeni su parovi listova sa poslednja tri vršna nodusa nekoliko biljaka, koji su korišćeni za izolaciju glandularnih trihoma abrazijom suvim ledom, kao i za ekstrakciju sadržaja listova dihlorometanom (*DCM*). U junu 2014. godine su uzorkovani listovi različitih razvojnih stadijuma, kao i stabla sa tri individue u fazi cvetanja, s ciljem uporedne analize ekspresije gena kandidata za iridoid sintazu (*NrISI*) i metaboličkog profilisanja iridoida.

3.1.2. Izolacija glandularnih trihoma abrazijom suvim ledom

Glandularni trihomi su prikupljeni korišćenjem metode abrazije suvim ledom (*Yerger i sar.*, 1992), uz modifikacije koje su predhodno opisali drugi autori (*Brukner i sar.*, 2013. i *Božić*, 2014). Približno 5 g sveže mase listova *N. rtanjensis* odvojeno je sa biljaka i smešteno u plastične tube od 50 ml sa zavrtnjem i uronjeno u tečni azot. U tube je dodato 3 cm³ fino usitnjenog suvog leda, nakon čega je biljni materijal homogenizovan 2 minuta na vorteks mešalici podešenoj na maksimalnu brzinu. Mešavina listova i suvog leda je, potom, izručena u cediljku (veličina pore 1,5 mm) i profiltrirana kako bi se glandularni trihomi i suvi led odvojili od ostataka listova u zasebnu tubu. Dodatno, korišćena je četkica od sintetičkog materijala kako bi se uklonili preostali glandularni trihomi sa površine listova nakon abrazije suvim ledom. Materijal je tokom čitavog postupka uklanjanja glandularnih trihoma, sa abaksijalne i adaksijalne strane listova, bio potopljen u tečni azot. Postupak je ponovljen nekoliko puta, dok nije prikupljeno dovoljno materijala za nekoliko različitih eksperimenata. Sav biljni materijal čuvan je na -80 °C do upotrebe.

3.1.3. Svetlosna mikroskopija

Analiza glandularnih i mehaničkih trihoma intaktnih listova *N. rtanjensis*, izolata trihoma, kao i listova nakon abrazije suvim ledom, urađena je pomoću svetlosnog mikroskopa (*Stereomicroscope Nikon SMZ18* sa *P2-SHR Plan Apo* objektivima, Tokio, Japan) na uveličanju do 40 puta. Mikrografije su napravljene pomoću digitalne kamere *Nikon DIGITAL SIGHT DS-Fi1c* (*Nikon*, Tokio, Japan).

3.1.4. Ramanova spektroskopija

Sadržaj peltatnih i kapitatnih glandularnih, kao i mehaničkih trihoma, izolovanih sa površine listova *N. rtanjensis*, analiziran je pomoću Ramanove spektroskopije. Kao standard za upoređivanje spektara korišćeno je etarsko ulje *N. rtanjensis*, koje se sastoji od približno 88% nepetalaktona (*Dmitrović i sar.*, 2015), kao i *cis,trans*-nepetalaktol (dobijen ljubaznošću dr Sare O' Konor sa Džon Ines centra u Noriču, Velika Britanija). Merenja na *XploRA* Ramanovom spektroskopu (*Horiba*, Japan) vršena su u opsegu 100–1800 cm⁻¹. Ramanovo rasejanje pobuđeno je *Nd/YAG* laserom na talasnoj dužini od 532 nm (maksimalne izlazne snage 20–25 mW). Disperzioni spektrograf ima rešetku od 1200 linija mm⁻¹. Spektri su sakupljeni u 10 merenja, a ukupno vreme snimanja je bilo po 10 s sa 50% filtera. Na kraju, spektri su obrađeni u programu *Origin Pro 8.6* (*OriginLab*, SAD).

3.1.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Na skenirajućem elektronskom mikroskopu (JSM-6390, JEOL, SAD) posmatrano je lice i naličje intaktnog lista *N. rtanjensis*, lista nakon abrazije suvim ledom i lista 40 s nakon uranjanja u DCM. Takođe, posmatrani su lice i naličje listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* netretiranih biljaka i biljaka nakon šest dana od postavljanja na podlogu obogaćenu PEG-om. Uzorci su bez prethodne fiksacije bili prekrivani nanometarskim slojem provodnog materijala (zlata) u uređaju *BAL-TEC SCD 005* (*BAL-TEC*, Nemačka), a zatim posmatrani na skenirajućem elektronskom mikroskopu sa radnim režimom na 15 kV.

3.1.6. Ekstrakcija sadržaja žlezdanih dlaka dihlorometanom

Sveže uzorkovani listovi biljaka *N. rtanjensis* uranjani su u staklene epruvete ispunjene sa po 3 ml DCM tokom 20, 40, 120 ili 300 s, i odlagani u staklene petri šolje. Nakon ovog postupka, ekstrakti su upareni preko noći u digestoru na sobnoj temperaturi. Na isti način osušeni su i listovi nakon uranjanja u DCM. Uzorci (suvi DCM ekstrakti) su rastvoreni u 99,8% metanolu (v:v=1:10). Osušeni listovi su homogenizovani do praha u tečnom azotu, rastvoreni u 99,8% metanolu (v:v=1:10) i ekstrahovani u ultrazvučnom kupatilu (*Sonorex*, *Bandelin*, Berlin, Nemačka) tokom 10 minuta. Nakon 15 minuta centrifugiranja na 10000 g, uzorci su profiltrirani kroz 0,2 µm celulozne filtere (*Agilent Technologies*, *Santa Clara*, SAD) i odloženi na 4 °C do dalje upotrebe. Za svaku vremensku tačku eksperimenta korišćeni su listovi sa tri različite biljke (tri biološka ponavljanja). Korišćen DCM je proizveden od strane kompanije *AppliChem* (Konektikat, SAD).

3.1.7. Priprema metanolnih ekstrakata

Ekstrakti listova *N. rtanjensis* u različitim fazama razvića su pripremljeni rastvaranjem 100 mg sveže mase biljnog materijala, spraćenog u tečnom azotu, u 1 ml 99,8% metanola (*AppliChem GmbH*, Nemačka). U istoj zapremini metanola je rastvoreno 100 mg suve mase liofilizovanih uzoraka izolata trihoma i listova nakon abrazije suvim ledom. Zatim su svi uzorci sonifikovani 10 min u ultrazvučnom kupatilu *Sonex* (tip RK-100, *Sonorex Bandelin Electronic*, Berlin, Nemačka), mešani na vorteks mešalici 20 s i centrifugirani 15 min na 10000 g. Nakon toga, supernatanti su profiltrirani kroz 0,2 µm celulozne filtere (*Agilent Technologies*, SAD) i čuvani na 4 °C do dalje upotrebe.

3.1.8. Orbitrap-MS analiza sadržaja nepetalaktona

Kvalitativna analiza metanolnog ekstrakta listova *N. rtanjensis* izvršena je na sistemu za tečnu hromatografiju sa kvaternarnom *Accela 600* pumpom i *Accela* autosemplerom, koji je povezan na hibridni maseni spektar visoke rezolucije (*UHPLC-LTQ Orbitrap XL*, *Thermo Fisher Scientific*, Nemačka) sa jonskim izvorom u obliku elektrosprej jonizacije (*HESI-II*, *Thermo Fisher Scientific*, Nemačka). Za razdvajanje jedinjenja metanolnog ekstrakta korišćena je analitička kolona *Hypersil gold C18* (100 × 2,1 mm, 1,9 µm) od proizvođača *Thermo Fisher Scientific* (Nemačka). Mobilna faza se sastojala od (A) vode + 0,1% mravlje kiseline i (B) acetonitrila + 0,1% mravlje kiseline. Primenjen je sledeći linearni gradijent mobilne faze: 0,0–1,0 min 5% (B), 1,0–12,0 min od 5% do 95% (B), 12,0–12,1 min od 95% do 5% (B), 5% (B) do 3 min., dok je protok bio 0,3 ml/min. Injekciona zapremina je iznosila 5 µl. Snimanje masenih spektara je vršeno u pozitivnom jonizacionom modu. Korišćeni parametri jonskog izvora navedeni su u radu Aničić i sar., 2018. *Xcalibur* softver (verzija 2.1) je upotrebljen za kontrolu instrumenta, kao i za prikupljanje i analizu podataka. Monoterpeni i iridoidi su identifikovani na osnovu odgovarajućih spektralnih karakteristika: tačna molekulska masa, karakteristična fragmentacija i karakteristično retenciono vreme. Fragmentacioni mehanizam i karakteristični fragmenti potvrđeni su pomoću softvera *Mass Frontier 6.0* (*Thermo Fisher Scientific*, Nemačka). *ChemDraw 12.0* (*PerkinElmer*, SAD) je korišćen za izračunavanje tačne mase jedinjenja od interesa. Acetonitril i mravlja kiselina su nabavljeni od kompanije *Merck* (Nemačka).

3.1.9. UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS analiza sadržaja nepetalaktona

Hromatografsko razdvajanje metanolnih ekstrakta urađeno je na sistemu *Dionex Ultimate 3000 UHPLC* (*Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka*) u čijem se sklopu nalazi binarna pumpa, vakuum degaser, termostat za kolone, auto-sempler i DA detektor (eng. *diode array detector, DAD*). UHPLC sistem je konfigurisan sa *triple-quadrupole* masenim spektrometrom (*TSQ Quantum Access MAX, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka*) sa elektron sprej jonizacijom (*HESI, eng. Heated Electro Spray Ionization*). Hromatografsko razdvajanje je urađeno na koloni *Hypersil gold C18* dimenzija $50 \times 2,1$ mm, sa česticama veličine $1,9 \mu\text{m}$ (*Thermo Fisher Scientific, SAD*).

Mobilna faza se sastojala od 0,1% rastvora mravlje kiseline (A) i acetonitrila (B), a uzorci su eluirani gradijentom prema šemi koja je opisana u radu Mišić i sar. (2015): 5–20% B u prva 3 minuta; 20–40% B od 3 do 5 minuta, 40–50% B od 5 do 7,5 minuta, 50–60% B u periodu od 7,5–8,5 minuta, 60–95% B od 8,5 do 10,5 minuta, 95% B do 11,5 minuta, 95% do 5% B od 11,5 do 12 minuta, i na kraju 5% B do 15 minuta. Protok je podešen na 0,4 ml po min, a talasne dužine na 225, 260 i 320 nm. Sve analize su urađene korišćenjem rastvora MS kvaliteta (*Merck, Darmstadt, Nemačka*). Kolona je termostatirana na $400 \text{ }^\circ\text{C}$, dok je injekciona zapremina bila $10 \mu\text{l}$. Za kontrolu UHPLC instrumenta korišćen je *Chromeleon Xpress* softver (*Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka*). Podešavanja masenog qqqMS spektrometra su bila sledeća: temperatura jonske probe $400 \text{ }^\circ\text{C}$, voltaža 4500 V, pritisak nosećeg gasa (N_2) 40 AU, pritisak gasa u jonskom izvoru 1,0 (AU), pritisak auksilarnog gasa 10 AU, temperatura kapilare $275 \text{ }^\circ\text{C}$ i podešavanje jonskih sočiva 0 V.

Podaci dobijeni na masenom spektrometru su praćeni u pozitivnom modu. U eksperimentima fragmentacije, disocijacija molekula je indukovana kolizijom (*CID, eng. collision-induced dissociation*), pri čemu je energija kolizione ćelije podešena na 30 eV. Jedinjenja od interesa su kvantifikovana u *SRM* modalitetu (eng. *selected reaction monitoring*), koji predstavlja najosetljiviji tip analize korišćenog instrumenta *Xcalibur* softver (verzija 2.1) je korišćen za kontrolu instrumenta, kao i za prikupljanje i obradu podataka. *Trans,cis*-nepetalakton i dehidronepetalakton su identifikovani na osnovu svojih *UV, MS* i *MS/MS* spektara, i poređenjem sa standardima. U eksperimentu u kome je analiziran sadržaj iridoida u listovima različitog razvojnog stadijuma, kvantifikacija je urađena kao što je ranije opisano (Mišić i sar., 2015), korišćenjem kalibracione krive etarskog ulja *N. cataria* sa unapred utvrđenim sadržajem oba izomera nepetalaktona (poklon prof. dr *Birkett, Harpenden Research, Velika Britanija*). Standardi su pripremljeni rastvaranjem etarskog ulja u metanolu, u odnosu 1:200 (v:v). Ostali kalibracioni nivoi su dobijeni daljim razblaživanjem stok rastvora do 1:2000 (v:v). Linerana regresiona analiza kalibracionih kriva je pokazala odličnu linearnost, uz korelacione koeficijente od $r=0,9977$, $p < 0,001$ za *trans,cis*-NL i $r = 0,9753$, $p < 0,001$ za *cis,trans*-NL. Kvantifikacija navedenih monoterpenoida u uzorcima je urađena na osnovu površine pikova u *SRM* eksperimentu. Rezultati su izračunati u jedinicama μg u 100 mg sveže mase uzorka ($\mu\text{g}/100 \text{ mg SM}$), a zatim predstavljeni relativno, u odnosu na sadržaj NL i DNL u stablu.

3.1.10. Gasna hromatografija sa masenom detekcijom (GC-MS) u analizi metanolnog ekstrakta *N. rtanjensis*

Gasna hromatografija sa masenom detekcijom (*GC-MS*) korišćena je za analizu metanolnog ekstrakta listova *N. rtanjensis*. Upotrebljen je gasni hromatograf *Shimadzu QP2010 plus GC-MS* sistem (*Shimadzu, Kjoto, Japan*), koji je povezan sa *split-splitless* injektorom. Hromatografsko razdvajanje rađeno je na koloni *ZB-1 MS* dimenzija $30\text{mm} \times 0,25\text{mm} \times 0,50\mu\text{m}$ (*Phenomenex, Austrija*). Hromatografski uslovi su bili podešeni na sledeće parametre: temperaturni gradijent $40\text{--}260 \text{ }^\circ\text{C}$ (u koracima od $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po min); a zatim je usledio izotermalni korak na $260 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 10 min. Injektovanje metanolnog ekstrakta ($2 \mu\text{l}$) je vršeno u *split* modu (1:30), dok je temperatura jonskog izvora bila $280 \text{ }^\circ\text{C}$. Mobilna faza/noseći gas bio je He (99,999%), protoka $1,6 \text{ ml/min}$. Elektronska jonizacija u

pozitivnom modu vršena je na +70eV. Identifikacija jedinjenja je izvršena upotrebom biblioteka masenih spektara *Wiley8*, *NIST05* i *FFNSCI*.

3.2. Analiza ekspresije gena biosintetskog puta nepetalaktona u listovima *N. rtanjensis* različitog razvojnog stadijuma i u izolovanim trihomima listova

3.2.1. Izolacija RNK

Uzorci su smrvljeni do sitnog praha u sterilnim avanima u tečnom azotu. Ukupna RNK iz stabla i listova različitih razvojnih stadijuma jedinki *N. rtanjensis* izolovana je pomoću trizol pufera koji je sadržao 0,8 M guanidin tiocijanat, 0,4 M amonijum tiocijanat, 0,1 M natrijum acetat pH 5,0, 5% glicerol, 38% fenola ekvilibrisanog u Tris rastvoru pH 8.0. U 100 mg tkiva dodato je 1 ml trizol pufera, nakon čega su uzorci inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi. U svaki uzorak je, zatim, dodato po 200 µl smeše hloroform-izoamil alkohol (v:v=24:1), čemu je usledilo mešanje na vorteksu tokom 20 s, 3 min inkubiranja na sobnoj temperaturi i 10 min centrifugiranja na 12000 g. Izdvojenoj gornjoj vodenoj fazi dodato je 250 µl izopropanola i pufera za precipitaciju RNK (0,4 M natrijum hlorid, 0,8 M natrijum citrat i 0,8 M hlorovodonična kiselina), nakon čega su uzorci inkubirani 30 min na -20 °C. Nakon precipitacije i centrifugiranja 10 min na 12000 g, supernatant je odliven, a RNK u talogu je isprana sa 1 ml hladnog 75% etanola. Zatim je RNK osušena u laminaru tokom 10 min i rastvorena u 50 µl vode tretirane dietilpirokarbonatom (*DEPC*, *Sigma-Aldrich*, Nemačka).

Izolacija RNK visokog kvaliteta iz trihoma i listova *N. rtanjensis* nakon abrazije suvim ledom izvršena je iz 100 mg tkiva korišćenjem *Spectrum™ Plant Total RNA* kompleta (*Sigma-Aldrich®*, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

Integritet izolovanih RNK potvrđen je elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Kvalitet RNK je proveren spektrofotometrijski na spektrofotometru (*HP Agilent 8453*, Nemačka) ili na aparatu *Nanodrop (N60 Nano-Photometer®)*, *Implen GmbH*, Nemačka), preračunavanjem odnosa intenziteta apsorbananci A_{260}/A_{230} i A_{260}/A_{280} i poređenjem sa referentim vrednostima (RNK je odgovarajućeg kvaliteta kada ovi količnici iznose 1,8–2,1). Koncentracije izolovanih RNK određene su fluorometrijski na aparatu *Qubit (Qubit 3.0 Fluorometer, ThermoFisher Scientific, SAD)* ili spektrofotometrijski prema formuli:

$$\text{RNK konc. } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260} \times 40 \times \text{faktor razblaženja}$$

Izolovane RNK su čuvane na -80 °C do daljeg korišćenja.

Elektroforeza na agaroznom gelu omogućavala je proveru kvaliteta nukleinskih kiselina, njihovo identifikovanje, kao i razdvajanje i prečišćavanje. Korišćeni su agarozni gelovi različitih koncentracija (0,8%–2%) u $1 \times \text{TBE}$ puferu (40 mM Tris-bor, 1 mM EDTA), sa dodatkom etidijum bromida pre polimerizacije (0,5 µg/ml). Elektroforetsko razdvajanje DNK i RNK je vršeno u $1 \times \text{TBE}$ puferu. Nukleinske kiseline su vizuelizovane na UV transiluminatoru *gel-Doc™ EQ System (Life Science Research, Bio-Rad Co., SAD)*. Za razdvajanje RNK, sistem za elektroforezu je dodatno tretiran 3% vodonik-peroksidom.

3.2.2. Reverzna transkripcija i sinteza komplementarne DNK (cDNK)

Pre reverzne transkripcije, ukupna RNK je tretirana DNK-azom (*DNase I, ThermoScientific, Litvanija*), kako bi se uklonili ostaci genomske DNK iz uzoraka. Količina unosa RNK je varirala u zavisnosti od eksperimenta (400 ng–1 µg), dok je unos ostalih komponenti reakcije bio u skladu sa uputstvom proizvođača (1 µl $10 \times$ reakcionog pufera sa MgCl_2 i 1 µl DNaze I koncentracije 1U/µl). Ukupna zapremina reakcione smeše bila je 10 µl. Posle 30 min inkubacije na 30 °C, reakcija je

zaustavljena dodavanjem 1 μ l 25 mM EDTA (*ThermoScientific*, Litvanija) i reakciona smeša je dodatno inkubirana 10 min na 65 °C.

Nakon tretmana DNK-azom, prevođenje lanaca RNK u komplementarne lance DNK (cDNK) je izvršeno pomoću kompleta *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (*ThermoScientific*, Litvanija) po uputstvu proizvođača. RNK iz prethodnog koraka je prvo inkubirana 5 min sa 1 μ l Oligo(dT)₁₈ prajmerima na 65 °C, kako bi se narušile vodonične veze sekundarnih struktura RNK. Zatim je izvršena reakcija reverzne transkripcije, koja se odvijala 60 minuta na 42 °C, a potom je okončana petominutnim zagrevanjem reakcione smeše na 70 °C.

3.2.3. Sekvenciranje transkriptoma i pretraga za genima kandidatima biosintetskog puta nepetalaktona i regulatornim transkripcionim faktorima

Komplet *SpectrumTM Plant Total RNA* (*Sigma-Aldrich*®, Nemačka) je, prema uputstvu proizvođača, upotrebljen za izolaciju RNK iz listova jedinki *N. rtanjensis*, koje su gajene u uslovima *in vitro*. Sekvenciranje i bioinformatičke analize dobijenih podataka uslužno je izvršila kompanija *Genomix4Life* (*Genomix4Life*, Baronisi, Italija). Transkriptomaska baza podataka je generisana pomoću platforme *Illumina HiSeq 2500* (*Illumina*, SAD). Korišćenjem algoritma *BLAST*, programa *BioEdit* verzije 7.2.5 (*Hall*, 2013), poređenjem sa poznatim sekvencama iz vrsta *C. roseus* i *M. spicata*, identifikovani su geni kandidati biosintetskog puta NL u transkriptomu listova *N. rtanjensis*, kao i transkripcionih faktora (TF). Na taj način je identifikovano 8 kandidata strukturnih gena biosintetskog puta NL (*GPPS*, *GES*, *G8O*, *8HGO*, *NEPS1a*, *NEPS1b*, *NEPS2* i *NEPS3*), kao i 5 gena kandidata za TF, koji regulišu biosintezu NL (*COII*, *JAZ3*, *MYC2*, *MYB* i *YABBY5*). Sekvence gena za NrIS1 i NrIS2 su izolovane iz trihoma *N. rtanjensis* i otkrivene sekvenciranjem, pre nego što je transkriptom postao dostupan. Svi navedeni geni kandidati su prikazivali visok procenat sličnosti sa funkcionalno okarakterisanim sekvencama baze *NCBI* iz različitih vrsta (eng. *National Center for Biotechnology Information, NCBI*).

3.2.4. Konstrukcija prajmera

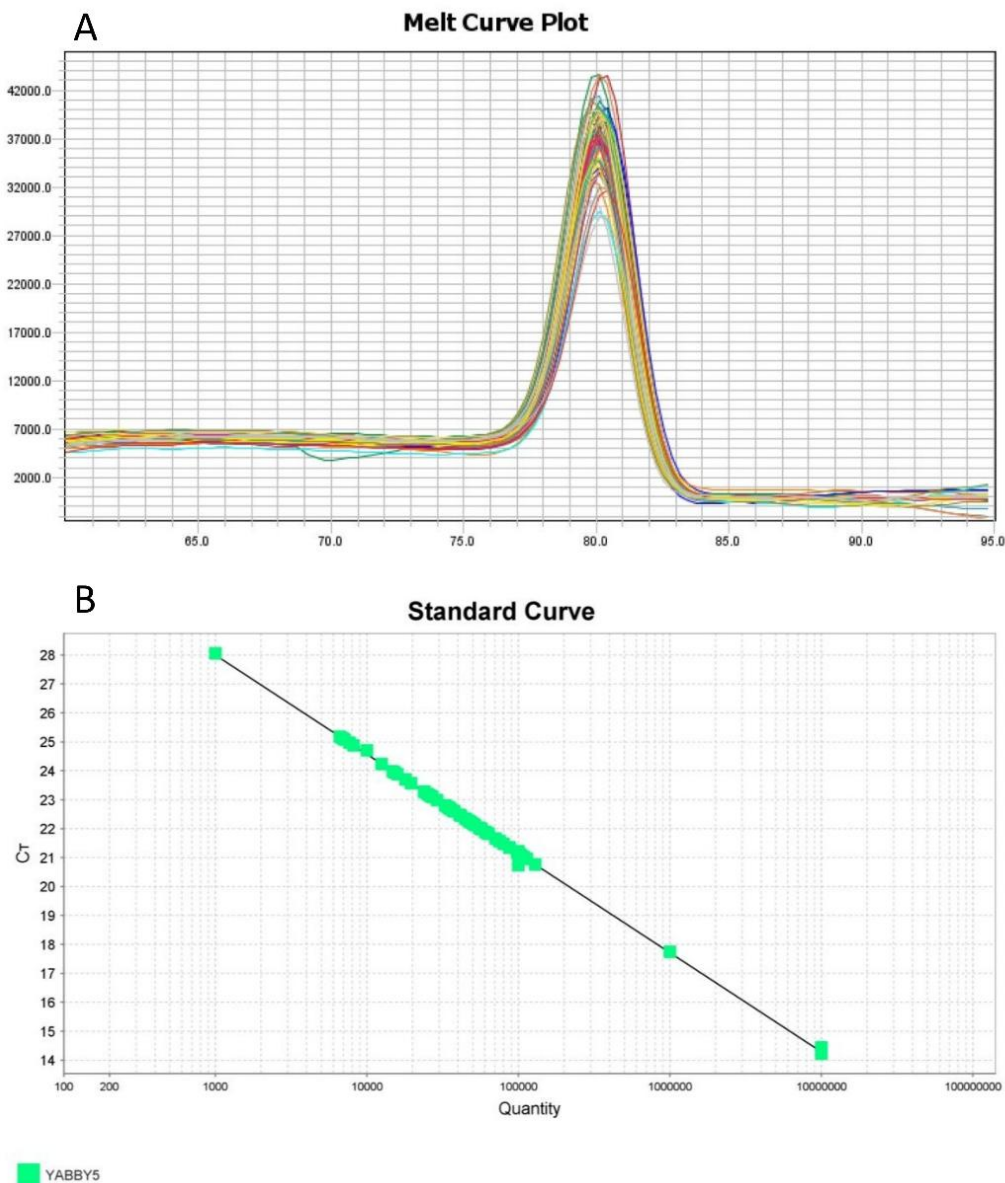
U **Tabeli 2.** su prikazani svi prajmeri koji su korišćeni u ovoj disertaciji. Prajmeri za *qPCR* su dizajnirani korišćenjem ekstenzija *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) pomoću zadatih parametara, kao i *Primer designing tool* na sajtu *NCBI*. Na kraju, kvalitet ovako konstruisanih prajmera proveren je korišćenjem ekstenzije *Primer designing tool*.

3.2.5. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (RT-qPCR)

Ekspresija gena uključenih u biosintetski put nepetalaktona u tkivima vrste *N. rtanjensis* analizirana je pomoću tehnike kvantitativnog *PCR*-a u realnom vremenu (eng. *real time PCR, RT-qPCR*). Za *RT-qPCR* korišćena je komercijalna smeša *MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2x* (*ThermoScientific*, Litvanija). Po 10 μ l reakcione smeše je nalivano u *qPCR* ploče sa 96 bunarića (*MicroAmpTM*, *Applied Biosystems*, SAD). Zapremina smeše od 10 μ l sadržala je 5 μ l *MaximaTM* smeše, 3,6 μ l vode, 0,2 μ M odgovarajućih prajmera (**Tabela 2.**) i 1 μ l cDNK. Prilikom analize ekspresije *NrIS1* u listovima različitih razvojnih stadijuma *N. rtanjensis* korišćena je mašina *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*, SAD), dok je u ostalim eksperimentima *RT-qPCR* analiza rađena pomoću uređaja *QuantStudio® 3 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*, SAD). Uslovi amplifikacije su bili sledeći: 10 min na 95 °C; 40 ciklusa od po 15 s na 95 °C, 30 s na 60 °C i 30 s na 72 °C; a zatim i 10 min na 72 °C.

Ekspresija gena od interesa određena je apsolutnom i relativnom kvantifikacijom. Od prečišćenih *qPCR* fragmenata napravljena je serija razblaženja od 10⁹ do 10² kopija po 1 μ l, koji su korišćeni kao standardi za apsolutnu kvantifikaciju ekspresije ciljanog gena. Nivo ekspresije gena od interesa određen

je i relativnom kvantifikacijom na osnovu $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metode (Livak i Schmittgen, 2001), a vrednosti su standardizovane u odnosu na referentni gen *18S rRNK* (Bogdanović i sar., 2013). Specifičnost amplifikacije svih gena potvrđena je analizom kriva topljenja, dok je efikasnost reakcija za sve gene bila u okviru preporučenih vrednosti (90–110%, nagib krive -3,1 do -3,6). Na primeru *NrYABBY5* prikazana je kriva topljenja (Slika 8A) i standardna kriva (Slika 8B).



Slika 8. Krive topljenja produkata *qPCR* amplifikacije za gen *NrYABBY5* (A). Ujednačen oblik krive i položaj maksimuma daju uvid u specifičnost amplifikacije. Standardna kriva za *NrYABBY5* sa poznatim koncentracijama amplifikovanih *PCR* produkata (nagib krive -3,428, efikasnost 95,7%).

3.2.6. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka u eksperimentu sa uporedom analizom ekspresije gena *NrIS1* i sadržaja nepetalaktona u različitim fazama razvića listova *N. rtanjensis* urađena je korišćenjem softvera *Minitab 17* (*Minitab Inc.*, SAD). Izvršena je analiza varijanse numeričkih podataka (*ANOVA*), dok je statistička značajnost razlika između srednjih vrednosti vršena *Tukey* testom, pri nivou značajnosti od

$p \leq 0,05$. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike. Studentovim t-testom utvrđena je značajnost razlika između nivoa ekspresije gena vezanih za biosintetski put NL u izolatu trihoma i listovima nakon abrazije suvim ledom. Nivoi značajnosti su prikazani zvezdicama, tako da je $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) i $p \leq 0,001$ (***)).

3.3. Eksperimentalna dehidracija izdanaka *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* korišćenjem polietilen glikola (PEG)

3.3.1. Biljni materijal

Polazni biljni materijal za uspostavljanje *in vitro* kultura izdanaka vrsta roda *Nepeta*, analiziranih u ovoj disertaciji, bila su njihova semena. Semena *Nepeta rtanjensis* sakupljena su 2013. godine sa biljaka odgajenih na eksperimentalnoj parceli Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Semena vrste *N. argolica* Bory & Chaub. subsp. *argolica* (syn. *N. sibthorpii* Bentham) sakupljena su 2009. godine u prirodnim populacijama na Peloponezu (GPS koordinate lokaliteta: 37°30'47.39"N; 22°20'24.64"E).

3.3.2. Uspostavljanje i održavanje *in vitro* kultura izdanaka vrsta roda *Nepeta*

Površinska sterilizacija je izvršena tretiranjem semena 20% rastvorom komercijalnog preparata natrijum hipohlorita („Snežnik”, Panonija, Pančevo, Srbija) sa 4% aktivnog hlora tokom 10 minuta. Zatim su semena pet puta isprana sterilnom dejonizovanom vodom. Nakon ispiranja sterilnom dejonizovanom vodom, površinski sterilisana semena su prebačena na ½ MS hranljivu podlogu (*Murashige* i *Skoog*, 1962), koja je sadržala 100 mg/l mio-inozitola, 20 g/l saharoze i 7 g/l agara (Torlak, Beograd, Srbija). pH vrednost hranljive podloge je podešena na 7,2 za vrste *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*. Nakon podešavanja pH vrednosti, hranljive podloge su sterilisane u autoklavu na 114 °C tokom 25 min. Biljke su gajene na 100 ml hranljive podloge u staklenim erlenmajerima zapremine 250 ml sa zapušačima od medicinske vate i gaze. Biljke su rasle u sobi za gajenje kultura u uslovima dugog dana (16/8 h režima svetlo/mrak), pri temperaturi od 25 °C ± 2 °C i relativnoj vlažnosti vazduha 60–70%. Kao izvor svetlosti korišćene su bele fluorescentne lampe („Tesla”, Pančevo,) snage 65 W i gustine fotonskog fluksa 47 μmol/m²s. Kulture izdanaka su umnožavane korišćenjem segmenata stabla sa po jednim nodusom, i prebacivanjem svake četvrte nedelje na istu hranljivu podlogu, do sakupljanja odgovarajuće količine biljnog materijala potrebne za izvođenje eksperimenata.

3.3.3. Eksperimentalna indukcija dehidracije kod dve vrste roda *Nepeta* pod uticajem PEG-a

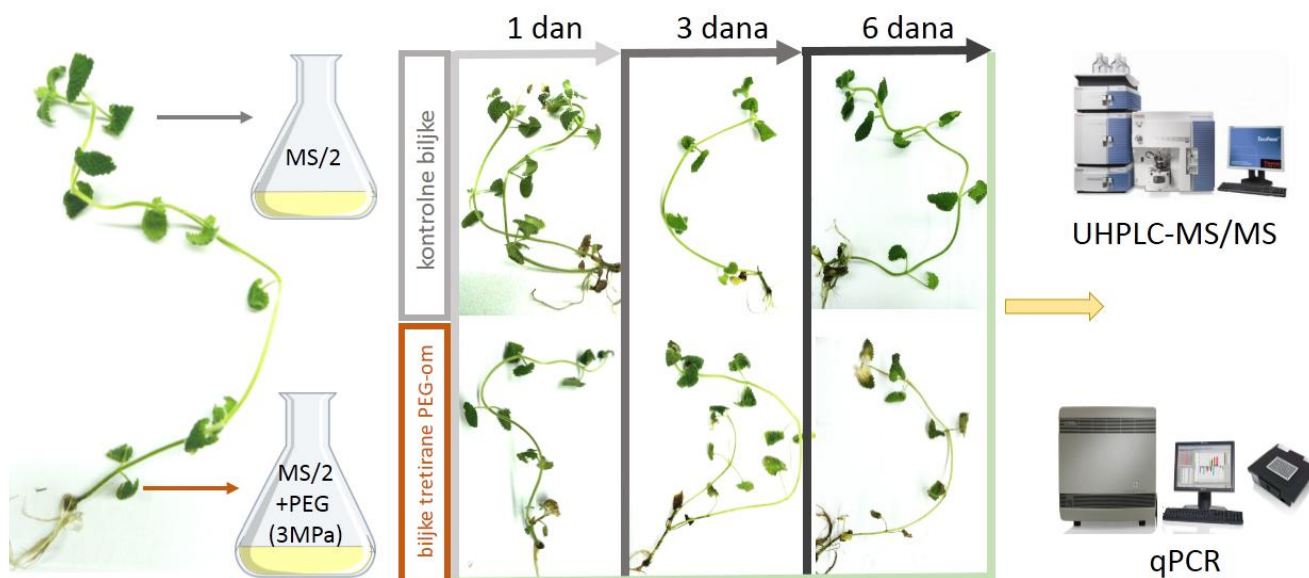
U cilju simuliranja vodnog deficita i dehidracije kod *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*, u uslovima *in vitro*, dodat je osmolit polietilen glikol (PEG) u ½ MS hranljivu podlogu. Hranljiva podloga sa PEG-om je pripremljena tako što je u tečnu ½ MS podlogu bez saharoze, nakon sterilizacije, dodatat PEG 8000 u koncentraciji od 505 g/l, tako da je vodni potencijal iznosio -3 MPa. Vodni potencijal medijuma je izračunat pomoću softverskog paketa (autor Giba Z., Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, Beograd), baziranog na Majklovoj jednačini (*Michel*, 1983):

$$\Psi = 1,29 \times [PEG]^2 T - 140 \times [PEG]^2 - 4 \times [PEG]; [PEG] = g \text{ PEG} / g \text{ H}_2\text{O}; T = +25 \text{ }^\circ\text{C}.$$



Slika 9. Jedinke vrste *Nepeta argolica* subsp. *argolica* nakon 72 h na ½ MS hranljivoj podlozi sa dodatkom PEG-a (desno) i bez dodatka PEG-a (levo)

Netretirana grupa biljaka gajena je na tečnoj ½ MS podlozi bez dodatka saharoze i PEG-a. Eksperiment je izveden postavljanjem ožiljenih biljaka na nosače od nerđajućeg čelika, u *Magenta* posude (*Sigma-Aldrich*, Nemačka) sa po 30 ml tečnog ½ MS hranljivog medijuma sa ili bez PEG-a. Četiri nedelje stari izdanci *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* postavljeni su tako da su im korenovi bili uronjeni u medijum (**Slika 9.**) Nakon jednog, tri i šest dana od postavke eksperimenta, listovi netretiranih i tretiranih biljaka sakupljeni su u tri biološka ponavljanja, zamrznuti u tečnom azotu i odloženi na -80 °C. Listovi poreklom sa po 8 jedinki gajenih u istoj *Magenta* posudi spojeni su u jedno biološko ponavljanje. Šematski prikaz eksperimenta predstavljen je na **Slici 10.**



Slika 10. Šematski prikaz eksperimenta indukovane dehidracije listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* u uslovima *in vitro*, korišćenjem PEG-a.

3.3.4. Određivanje relativnog sadržaja vode

Relativni sadržaj vode (eng. *relative water content*, *RWC*) meren je kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa PEG-om i netretiranih biljaka nakon jednog, tri i šest dana po postavci eksperimenta. Sveža masa biljaka (*FW*, eng. *Fresh Weight*) merena je neposredno nakon uzorkovanja. Biljke su potom inkubirane 24 h u destilovanoj vodi na sobnoj temperaturi i odmerena je masa u stanju punog turgora (*TW*, eng. *Turgid Weight*). Nakon sušenja na 70 °C tokom 72 h, ili do dostizanja konstantne mase, zabeležena je suva masa biljaka (*DW*, eng. *Dry Weight*). Za izračunavanje *RWC*-a korišćena je formula prema Sleyteru (Sleyter, 1967):

$$RWC (\%) = (FW-DW)/(TW-DW) \times 100$$

Merenja su izvršena u tri ponavljanja za svaku vremensku tačku eksperimenta, pri čemu je svako ponavljanje predstavljala jedna biljka.

3.3.5. UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS analiza sadržaja nepetalaktona

Metanolni ekstrakti listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* napravljeni su rastvaranjem 100 mg suve mase liofilizovanih listova, sprasanih u tečnom azotu, u 1 ml 99,8% metanola (*AppliChem GmbH*, Nemačka). Postupak pripreme ekstrakata je opisan u poglavlju 3.1.7.

Postupak UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS analize sadržaja nepetalaktona takođe je predstavljen u odeljku 3.1.9. U eksperimentu dehidratacije izazvane PEG-om, semikvantifikacija svih iridoida izvršena je korišćenjem kalibracione krive 8-oksogeraniala (*Santa Cruz Biotechnology*, SAD), koja je pokazala dobru linearnost ($r = 0.9889$, $p < 0.001$). Podešavanja masenog *qqqMS* spektrometra su bila sledeća: temperatura jonske probe 300 °C, voltaža 4000 V, pritisak nosećeg gasa (N₂) 28 AU, pritisak gasa u jonskom izvoru 1.0, pritisak auksilarnog gasa 10 AU, temperatura kapilare 275 °C i podešavanje jonskih sočiva 0 V.

3.3.6. Izolacija RNK

Izolacija RNK iz listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*, u eksperimentu sa PEG-om, izvršena je pomoću izmenjene metode opisane u radu Gasic i sar. (2004). Na približno 150 mg homogenizovanog tkiva dodato je po 650 µl ekstrakcionog pufera (100 mM Tris-HCl pH = 8, 25mM Na-EDTA, 2M NaCl, 0,5 g/l spermidin, 2% solubilni polivinilpirolidon-PVP, 2% cetiltrimetilamonijumbromid-CTAB), a zatim i 15 µl β-merkatptoetanol. Odmah nakon toga, uzorci su homogenizovani 20 s na vorteks mešalici, a potom su 15 min inkubirani u vodenom kupatilu na 60 °C. Po 650 µl smeše hloroform-izoamil alkohol (24:1=v:v) dodato je u svaki uzorak, nakon čega je usledilo mešanje na vorteks mešalici u trajanju od 20 s. Centrifugiranje tokom 10 min na 12000 g dovelo je do izdvajanja supernatanta sa rastvorenim RNK, koji je prebačen u nove tube, a zatim je u svaki uzorak dodato po 166 µl 7,5 M LiCl. Uzorci su inkubirani preko noći na +4 °C kako bi RNK precipitirala. Narednog dana, uzorci su centrifugirani 45 min na 12000 g, supernatant je odbačen i RNK precipitat je ispran sa 1 ml 70% etanola. Nakon toga, talog sa RNK je ponovo rastvoren u smeši koja je sadržala 50 µl vode, 10 µl Na-acetata (pH = 5,5) i 275 µl etanola. Uzorci su inkubirani 2 h na -80 °C, kako bi RNK precipitirala. Posle 45 min centrifugiranja na 12000 g, odlivanja supernatanta, ispiranja RNK precipitata 70% etanolom i sušenja u laminaru (10 min), talog je ponovo rastvoren u 50 µl vode. Usledili su tretman DNK-azom i reverzna transkripcija, koji su opisani u odeljku 3.2.2.

3.3.7. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (RT-qPCR)

RT-qPCR analiza je rađena pomoću uređaja *QuantStudio® 3 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, *Thermo Fisher Scientific*, SAD). Uslovi amplifikacije su opisani u odeljku 3.2.5. Kao endogena kontrola korišćen je gen kandidat za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH), čija je sekvenca pronađena u transkriptomu *N. rtanjensis*. Postupak dizajniranja prajmera za qPCR opisan je u

odeljku **3.1.11**. Isti setovi prajmera, koji su dizajnirani na osnovu sekvenci iz transkriptoma *N. rtanjensis*, korišćeni su za amplifikaciju gena biosinteze NL i u listovima vrste *N. argolica* subsp. *argolica*.

3.3.8. Statistička obrada podataka

Studentovim t-testom za neuparene uzorke (eng. *unpaired Students t-test*) utvrđena je značajnost razlika u nivoima ekspresija gena vezanih za biosintetski put NL u listovima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* nakon 1, 3 i 6 dana PEG tretmana (DPT) između tretiranih i netretiranih biljaka. Nivoi značajnosti su prikazani zvezdicama, tako da je $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) i $p \leq 0,001$ (***). Statistička analiza i vizualizacija izvršeni su u R programskom jeziku pomoću odgovarajućih paketa (*R Core Team*, 2018, *Warnes* i sar., 2016)

3.3.9. Filogenetska analiza

Za filogenetsku analizu NEPS kandidata višestruko poravnanje sekvenci izvršeno je pomoću programa *Clustal W* iz softverskog paketa *MEGA* verzija 6.0. Za trimovanje divergentnih regiona višestrukog poravnanja sekvenci i dobijanje visoko konzerviranih blokova, korišćen je program *Gblocks* verzija 0.91b. Filogenetska analiza konzerviranog bloka višestrukog poravnanja sekvenci izvršena je pomoću metode najveće verovatnoće (eng. *maximum likelihood*) u programu *MEGA* 6.0 sa 1000 butstrap (eng. *bootstrap*) permutacija. Identifikacioni brojevi sekvenci korišćenih za filogenetsku analizu prikazani su u Prilogu u **Tabeli P1**.

Filogenetska analiza pretpostavljenih aminokiselinskih sekvenci transkripcionih faktora izvršena je korišćenjem metode „povezivanja suseda” (eng. *neighbour-joining*) u programu *MEGA X* sa 1000 butstrap (eng. *bootstrap*) permutacija. Višestruko poravnanje sekvenci je generisano pomoću programa *Clustal W*. Identifikacioni brojevi sekvenci korišćenih za filogenetsku analizu prikazani su u Prilogu u **Tabeli P1**.

3.4. Izolacija i funkcionalna karakterizacija iridoid sintaza (IS) iz nekoliko vrsta roda *Nepeta*

3.4.1. Izolacija pune dužine gena za iridoid sintazu (IS)

3.4.1.1. Biljni materijal

Polazni materijal za vrstu *N. ernesti-mayeri* Diklić i Milojević bila su semena sakupljena 2009. godine na lokalitetu Trpejca, Severna Makedonija (GPS koordinate lokaliteta: 40°57'51.95"N; 20°47'9.00"E), dok su semena *N. parnassica* Heldr. & Sart. sakupljena iste godine na planini Parnas u Grčkoj (GPS koordinate lokaliteta: 38°29'23.48"N; 22°34'15.10"E). Donacijom botaničke bašte u Esenu (Nemačka) dobijena su semena vrsta *N. sibirica* L. i *N. nervosa* Royle ex Bentham. Sva semena korišćena u izradi ove disertacije čuvana su na -20 °C do trenutka upotrebe.

U odeljku **3.3.2**. je opisan postupak uspostavljanja i održavanja *in vitro* kulture vrsta roda *Nepeta*. Klijanje semena *N. ernesti-mayeri* je indukovano 1 mM rastvorom GA₃ koji je sadržao i 500 mg/l nistatina, tokom 24 h. pH vrednost hranjive podloge je podešena na 5,8 za vrste *N. sibirica* i *N. nervosa*, dok je za vrste *N. rtanjensis*, *N. ernesti-mayeri*, *N. parnassica* i *N. argolica* subsp. *argolica* iznosila 7,2. Izolat glandularnih trihoma *N. rtanjensis* (odeljak **3.1.2.**) i listovi vrsta *N. parnassica*, *N. ernesti-mayeri*, *N. argolica* subsp. *argolica*, *N. sibirica* i *N. nervosa* iz kulture *in vitro*, upotrebljeni su za izolaciju gena kandidata za IS.

3.4.1.2. Izolacija RNK

Iz tkiva koja su korišćena za izolaciju fragmenata i pune dužine gena iridoid sintaze (IS), tačnije iz žlezdanih dlaka i listova bez dlaka *N. rtanjensis*, kao i iz listova *N. parnassica*, *N. argolica* subsp. *argolica*, *N. ernesti-mayeri*, *N. sibirica* i *N. nervosa*, izolacija RNK visokog kvaliteta izvršena je iz 100 mg tkiva pomoću *Spectrum™ Plant Total RNA* kompleta (*Sigma-Aldrich®*, Hamburg, Nemačka) po uputstvu proizvođača. Postupak reverzne transkripcije prikazan je u odeljku 3.2.2.

3.4.1.3. Konstrukcija prajmera

Svi prajmeri korišćeni u ovoj disertaciji prikazani su u **Tabeli 2**. Degenerativni prajmeri su konstruisani na osnovu konzerviranih regiona aminokiselinskih sekvenci, koji su identifikovani poravnavanjem sekvenci. Prajmeri za izolaciju pune dužine gena i za *qPCR* su dizajnirani korišćenjem ekstenzija *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) pomoću zadatih parametara, kao i *Primer designing tool* na sajtu *NCBI* (eng. *National Center for Biotechnology Information*) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Prajmeri za restrikciono kloniranje konstruisani su na osnovu sekvenci prajmera za izolaciju pune dužine gena, kojima su dodate sekvence restrikcionijskih mesta odabranih restrikcionijskih enzima. Aktivnost restrikcionijskih enzima je manje efikasna na samim krajevima sekvenci, zbog čega se po pravilu, sekvencama direktnog i reverznog prajmera ispred restrikcionijskih mesta dodaje produžetak od šest baznih parova. Na kraju, kvalitet ovako konstruisanih prajmera proveren je korišćenjem softvera *Primer designing tool*.

3.4.1.4. Umnožavanje fragmenta genskih sekvenci *PCR* tehnikom

Metoda amplifikacije lančanom reakcijom polimeraze u ovoj disertaciji je upotrebljena u većem broju eksperimenata i sa različitim krajnjim ciljem. Bilo da je u pitanju dijagnostička potvrda uspešnosti kloniranja, izolacija fragmenata ili cele dužine gena, ili umnožavanje fragmenata za standardizaciju metode *PCR* u realnom vremenu (*qRT-PCR*), neophodno je bilo primeniti metodu *PCR*.

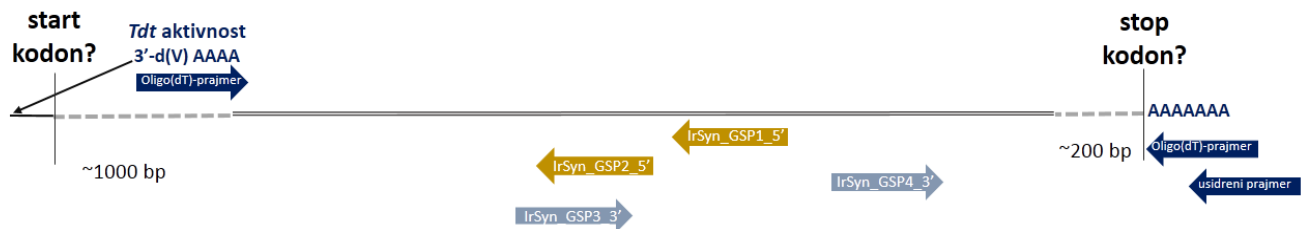
Fragmenti gena kandidata za iridoid sintazu izolovani su iz žlezdanih dlaka listova *N. rtanjensis* *PCR* amplifikacijom sa degenerativnim prajmerima (**Tabela 2**.) Kao matrica za umnožavanje fragmenta od interesa korišćeno je 3 µl cDNK žlezdanih dlaka u ukupnoj zapremini *PCR* reakcije od 50 µl. Reakciona smeša sadržala je komponente iz kompleta *AmpliTaq Gold* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) u sledećim zapreminama: 10 µl 5 × reakcionog pufera; 5 µl 25 mM MgCl₂; 3,7 µl 10 mM dNTP smeše; po 2 µl 25 mM direktnog i reverznog prajmera; 23,8 µl vode za injekcije (Galenika a.d., Srbija) i 0,5 µl polimeraze *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD). *PCR* reakcija izvedena je u *PCR* mašini *Eppendorf Mastercycler Nexus* (*Eppendorf*, Nemačka). Reakcija je započeta inicijalnom denaturacijom na 95 °C u trajanju od 10 min, a zatim je usledilo 43 ciklusa denaturacije od po 20 s na 94 °C, 30 s hibridizacije na 52 °C i 1 min elongacije na 72 °C; da bi se završila finalnim korakom elongacije na 72 °C u trajanju od 7 min.

Fragmenti gena kandidata biosintetskog puta nepetalaktona i transkripcionih faktora umoženi su konvencionalnim *PCR*-om, kako bi se koristili kao standardi u apsolutnoj kvantifikaciji *PCR*-a u realnom vremenu (*RT-qPCR*). Reakciona smeša se sastojala od 10 µl 5 × reakcionog pufera i 0,5 µl polimeraze iz kompleta *Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase* (*ThermoScientific*, Litvanija); zatim 1 µl 10 mM dNTP smeše (*ThermoScientific*, Litvanija), 32,5 µl vode za injekcije (Galenika a.d., Srbija), 5 µl smeše 10 µM vodenog rastvora direktnog i reverznog prajmera (**Tabela 2**.) i 1 µl cDNK listova *N. rtanjensis*. Ukupna zapremina reakcije je bila 50 µl. Uslovi *PCR* reakcije su bili sledeći: 98 °C tokom 30 s; 40 ciklusa od po 10 s na 98 °C, 30 s na 60 °C i 45 s pri 72 °C; i zatim 72 °C tokom 7 min.

3.4.1.5. Brza amplifikacija cDNK krajeva (*RACE*)

Tehnika brze amplifikacije cDNK krajeva (eng. *Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE*) koristi se u cilju otkrivanja nepoznatih 5' (*5'-RACE*) i 3' (*3'-RACE*) regiona iRNK onda kada je dovoljno veliki unutrašnji deo sekvence poznat za hibridizaciju sa specifičnim prajmerima. Pošto je sekvenciranje *PCR* produkata amplifikovanih degenerativnim prajmerima otkrilo sekvence fragmenata gena kandidata za iridoid sintazu vrste *N. rtanjensis*, dizajnirani su specifični prajmeri (**Tabela 2.**) za otkrivanje pune dužine gena tehnikama *5'-RACE* i *3'-RACE*.

Prvi korak tehnike *5'-RACE* je reverzna transkripcija u kojoj se deo ciljane iRNK prevodi u cDNK počev od poznatog regiona, koji se definiše prvim specifičnim prajmerom za gen (*GSP1_5'*) (**Slika 10.**). Reakcije ovakvih reverzних transkripcija odvijaju se na visokim temperaturama, kako bi se raskinule sekundarne strukture RNK, što je posebno važno kod sinteze veoma dugih cDNK. Zbog toga, u ovakvim reakcijama uglavnom se koristi *Transcriptor* reverzna transkriptaza, koju odlikuje visoka specifičnost i termostabilnost, ali i aktivnost RNaze H za degradovanje ostataka RNK i hibrida RNK-DNK (**Slika 11.**). U sledećem koraku tehnike *5'-RACE* koristi se aktivnost terminalne dezoksiribonukleotid transferaze (TdT) za dodavanje homopolimernih adeninskih nastavaka na 3' kraj sintetisanih cDNK. U poslednjem koraku, *PCR*-om se umnožava region sekvence ograničen Oligo(dT) usidrenim (eng. *anchored*) prajmerom (sa određenom kratkom sekvencom „sidra” na kraju dT) i drugim prajmerom specifičnim za gen (*GSP2_5'*), koji je pozicioniran nizvodno ka 5' kraju u odnosu na *GSP1_5'*. Metoda *3'-RACE* koristi postojeće adenozne nastavke na 3' kraju iRNK, i počinje klasičnom reverznom transkripcijom sa usidrenim Oligo(dT) prajmerom. Zatim sledi *PCR* amplifikacija koju ograničava treći prajmer specifičan za gen (*GSP3_3'*) i usidreni Oligo(dT) prajmer (**Slika 11.**). Dodatno se uvodi korak tzv. ugnježdenog (eng. *nested*) *PCR*-a, kako bi se osigurala specifičnost izolovane sekvence, sa nizvodnim prajmerom (*GSP4_3'*) i usidrenim prajmerom (sa identičnom sekvencom „sidra”).

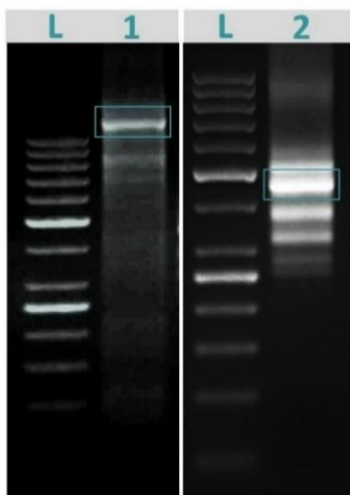


Slika 11. Postupak *RACE PCR* na primeru sekvence za iridoid sintazu. Dvostrukom linijom naznačen je poznati fragment dužine ~250 bp, a isprekidanim sivim linijama su naznačeni nepoznati regioni. Zlatnim strelicama su obeležene pozicije prajmera za *5'-RACE*, sivim za *3'-RACE*, a plavim za pozicije prajmera iz kompleta.

Koraci *5'-RACE* i *3'-RACE* izvršeni su pomoću kompleta *5'/3' Race Kit, 2nd Generation* (Roche, Manhajm, Nemačka). Reakciona smeša reverzne transkripcije *5'-RACE* sadržala je sledeće komponente: 1 µg RNK žlezdanih dlaka *N. rtanjensis*, 4 µl pufera za sintezu cDNK iz kompleta, 2 µl dNTP smeše, 1 µl 12,5 µM *GSP1_5'* prajmera, 1 µl *Transcriptor* reverzne transkriptaze i vode za injekcije (Galenika a.d., Srbija) do ukupne zapremine od 20 µl. Reakcija reverzne transkripcije se odvijala 60 min na 55 °C, nakon čega je zaustavljena inkubiranjem 5 min na 85 °C. Pre daljeg korišćenja, cDNK je prečišćena pomoću kompleta *Silica Bead Dna Gel Extraction* (Fermentas, SAD). U sledećem koraku, u kome se vrši dodavanje adeninskih nastavaka, smeša prečišćene cDNK (19 µl), 2,5 µl 10 × reakcionog pufera iz kompleta i 2,5 µl 2mM dATP, inkubirana je 3 min na 94 °C, nakon čega je ohlađena na ledu. U smešu je dodato 1 µl terminalne transferaze i reakcija je inkubirana 20 min na 37 °C, nakon čega je izvršena toplotna inaktivacija enzima inkubiranjem 10 min na 70 °C. *PCR* reakciona smeša bila je sačinjena od 5

μl cDNK sa adeninskim nastavkom, 1 μl Oligo(dT) prajmera iz kompleta, 1 μl 12,5 μM GSP2_5' prajmera, 1 μl dNTP miksa, 10 μl pufera *One Taq Standard reaction buffer* (*New England Biolabs*, SAD), 0,25 μl polimeraze *One Taq Hot Start Polymerase* i vode za injekcije do ukupne zapremine od 50 μl (31,75 μl). Uslovi reakcije su bili sledeći: 95 °C 10 min; 35 ciklusa 94 °C 20 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s; i 72°C 7 min. Nakon *PCR*-a, proizvod je proveren na agaroznom gelu, gde su uočene dve trake (Slika 12.). Pomoću kompleta *GeneGet Gel Extraction Kit* (*ThermoScientific*, Litvanija;) je prečišćen najduži ampikon.

Sinteza cDNK za 3'-*RACE* izvršena je po postupku opisanom za 5'-*RACE*, s tom razlikom što je GSP1_5' prajmer zamenjen sa 1 μl Oligo(dT) prajmera iz kompleta. Nakon reverzne transkripcije cDNK je umnožena *PCR*-om bez prethodnog prečišćavanja. *PCR* reakciona smeša je sadržala: 1 μl cDNK iz prethodnog koraka, 1 μl usidrenog prajmera iz kompleta, 1 μl 12,5 μM GSP5_3' prajmera, 1 μl dNTP miksa, 10 μl pufera *One Taq Standard reaction buffer* (*New England Biolabs*, SAD), 0,25 μl polimeraze *One Taq Hot Start Polymerase* i vode za injekcije do ukupne zapremine od 50 μl (35,75 μl). Uslovi reakcije su bili kao i za 5'*RACE PCR*, izuzev što je temperatura hibridizacije bila 57 °C. U narednom ugnježđenom *PCR*-u, matrica je bio proizvod prethodne *PCR* reakcije (1 μl), a reakciona smeša je napravljena na isti način, uz dodatak 1 μl 12,5 μM GSP6_3'. Temperatura hibridizacije je bila 60 °C, dok su ostali uslovi *PCR* programa ponovljeni. Na agaroznom gelu je uočeno više traka različitih dužina (Slika 12.), a najduži ampikon je prečišćen pomoću kompleta *GeneGet Gel Extraction Kit* (*ThermoScientific*, Litvanija).

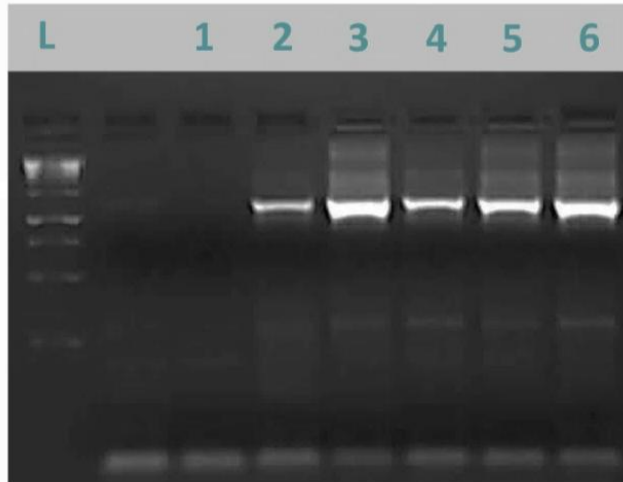


Slika 12. 5'-*RACE* (1) i 3'-*RACE* (2) *PCR* produkti. L–DNK marker. Plavi pravougaonici obeležavaju odabrane ampikone koji su prečišćeni iz agaroznog gela i korišćeni dalje kao inserti za TA kloniranje i sekvenciranje.

3.4.1.6. Umnožavanje pune dužine gena kandidata za iridoid sintazu iz *N. parnassica*, *N. argolica* subsp. *argolica*, *N. ernesti-mayeri*, *N. sibirica* i *N. nervosa*

Sekvence pune dužine gena kandidata za iridoid sintazu izolovane su iz listova nekoliko vrsta roda *Nepeta* *PCR* amplifikacijom. Kao matrice u ovim reakcijama korišćene su cDNK listova *N. parnassica*, *N. argolica* subsp. *argolica*, *N. ernesti-mayeri*, *N. sibirica* i *N. nervosa* iz kulture *in vitro*, kao i cDNK žlezdanih dlaka i listova *N. rtanjensis* bez trihoma. Specifični prajmeri za izolaciju pune dužine gena (Tabela 2.) konstruisani su na osnovu regiona start i stop kodona otkrivenih sekvenciranjem produkata 5'-*RACE* i 3'-*RACE PCR*-a iz žlezdanih dlaka *N. rtanjensis*. Pošto je sekvenciranje potvrdilo tri različite sekvence u žlezdanima dlakama *N. rtanjensis*, kako bi se simultano izolovale sve postojeće varijante pune dužine gena za iridoid sintazu u drugim vrstama roda *Nepeta* primenjen je multipleks

PCR. Reakciona smeša je bila sačinjena od komponenti iz kompleta *AmpliTaq Gold* (Thermo Fisher Scientific, SAD) u sledećim zapreminama: 5 μ l 10 \times reakcionog pufera; 3 μ l 25 mM MgCl₂; 5 μ l 10 mM dNTP smeše; po 1 μ l 25 mM jednog degenerativnog direktnog i dva reverzna prajmera; 30,75 μ l vode za injekcije (Galenika a.d., Srbija) i 0,25 μ l polimeraze *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Kao matrica je korišćeno 3 μ l cDNK listova jedinki vrsta roda *Nepeta*. Finalna zapremina reakcija iznosila je 50 μ l. Reakcija je započeta inicijalnom denaturacijom na 95 °C u trajanju od 10 min; a zatim je usledilo 43 ciklusa denaturacije od po 20 s na 94 °C 20 s, 30 s hibridizacije na 53 °C 30 s i 1 min elongacije na 72 °C 1 min; da bi bila prekinuta finalnim korakom elongacije na 72 °C u trajanju od 7 min. Produkti ovih reakcija prikazani su na **Slici 13**.



Slika 13. *PCR* produkti amplifikovani prajmerima za izolaciju pune dužine gena za IS. Kao matrice su korišćene cDNK iz listova *N. rtanjensis* nakon abrazije suvim ledom (1), kao i listovi *N. argolica* subsp. *argolica* (2), *N. ernesti-mayeri* (3), *N. parnassica* (4), *N. sibirica* (5) i *N. nervosa* (6). L–DNK marker.

3.4.1.7. Dodavanje restrikcionih mesta na sekvence gena kandidata za IS pomoću *PCR* tehnike

Prilikom dizajniranja prajmera, na postojeće sekvence za izolaciju pune dužine gena dodate su palindromske sekvence restrikcionih enzima na direktni (*KpnI*) i reverzni (*SacI*) prajmer. Na 5'-kraj prajmera se ubacuje i dodatnih 3–6 baznih parova, koji povećavaju efikasnost restrikcione digestije. Kao matrice za ove *PCR* reakcije korišćeno je sedam različitih konstrukata, odnosno plazmida *pTZ57R/T* sa sedam različitih gena kandidata za IS, koje je potvrdilo sekvenciranje. Reakciona smeša *PCR* reakcije je bila sledeća: 10 μ l 5 \times *Phusion HF Buffer* (Thermo Scientific, Litvanija), 0,5 μ l *Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase* (ThermoScientific, Litvanija), 1 μ l 10 mM dNTP smeše, 5 μ l 10 mM smeše direktnog i reverznog prajmera, 1 μ l konstrukta koncentracija 1–2 ng/ μ l i 32,5 μ l vode za injekcije. Finalna zapremina reakcije je iznosila 50 μ l. Uslovi *PCR* reakcije su bili sledeći: 98 °C na 30 s; 40 ciklusa od po 10 s na 98 °C, 30 s na 60 °C i 45 s pri 72 °C; i 72 °C tokom 7 min.

Svi produkti *PCR*-a proveravani su na agaroznom gelu, dok su koncentracije onih koji su korišćeni dalje u eksperimentima određivane spektrofotometrijski ili fluorometrijski. Svi uzorci su čuvani na -20 °C do upotrebe.

Tabela 2. Sekvence prajmera koje su korišćene u ovoj disertaciji. U Tabeli se navodi funkcija, tip prajmera, kao i korišćena temperatura hibridizacije tokom *PCR* amplifikacije – T(°C)

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5'–3')	Gen	Funkcija	T(°C)	Tip prajmera
IrSyn855Nep F	TTYAARTGGAARCAITTYTGG	<i>IS</i>	Fragment IS	52	Degenerativni
IrSyn1083Nep R	YTCYTTNSWYTRTTCAT				
IrSynGPS1_5'	CAGCCCATTCTCCCTCACGA	<i>IS</i>	Otkrivanje start i stop kodona	55	5'-RACE
IrSynGPS2_5'	CCCAAAGTGGACCTTTGTCCTTCAT	<i>IS</i>		57	
IrSynGPS3_3'	GCAGGATCTGATGAAGGACAAAGGT	<i>IS</i>		59	3'-RACE
IrSynGPS4_3'	GAGGATGTGGGGAATTGGTGGTTTAG	<i>IS</i>		60	
Oligo(dT) prajmer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC TTTTTTTTTTTTTTTTV	<i>IS</i>		57/59	RACE PCR
Usidreni prajmer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	<i>IS</i>		60	
IrSyn_FL_F	ATGAGCTGGWGGGCT	<i>IS</i>	Otkrivanje	53	Izolacija pune dužine gena
IrSyn_FL_R1	TCAAGGAACGATCTTGTAAGC	<i>IS</i>	pune dužine		
IrSyn_FL_R2	TCAGGGAACAATCTTGAAAGC	<i>IS</i>	gena		
IrSyn_FL_F_SacI	GCATGAGAGCTCATGAGCTGGTGGTG	<i>IS</i>	Dodavanje restrikcioni mesta	64	Prajmeri za kloniranje
IrSyn_FL_R1_KpnI	GCATGAGGTACCTCAGGGAACAATCTT GAAAGC	<i>IS</i>			
IrSyn_FL_R2_KpnI	GCATGAGGTACCTCAAGGAACGATCTT GTAAGC	<i>IS</i>			
18s F	TGACGGAGAATTAGGGTTCG	<i>18s</i>	Referentni gen	60	qPCR
18s R	CAATGGATCCTCGTTAAGGG				
NrGAPDH F	GGCAAAGTTCTCCCTGCTCT	<i>GAPDH</i>	Referentni gen	60	qPCR
NrGAPDH R	ATACTCGACCTGTTGTCGCC				
NrGPPS F	GACCCAATGCTGTCGATTTT	<i>GPPS</i>		60	qPCR
NrGPPS R	GCAAGTAGGCCTCCACAGAC				
NrGES F	TGGTTCAATGGTGAATTGC	<i>GES</i>		60	qPCR
NrGES R	GAGATCATCCCAAAGGCGAA				
NrG80 F	CGTCGCTAAAGAAGTCTTCCA	<i>G80</i>		60	qPCR
NrG80 R	CGGAGTACTTGAAGTGGTCGT				
Nr8HGO F	TGGTTAAGGTGGATCCGAAG	<i>8HGO</i>	Geni biosintetskog	60	qPCR
Nr8HGO R	CTTTTGCCCTTATCGCGTCTC				
NrIS1 F	TGGGGAGTATGAGGAAGGGC	<i>IS1</i>	puta nepetalaktona	60	qPCR
NrIS1 R	AACCACCAATCCCCACATC				
NrIS2 F	ATGTGGGGAGTACGAGTCCG	<i>IS2</i>		60	qPCR
NrIS2 R	GGTCCGGTGTGGGATCAAAT				
NrNEPS1a F	AACTGCGTGACACCATCTGT	<i>NEPS1a</i>		60	qPCR
NrNEPS1a R	ATGTCCAGTGATGAAGGCGG				
NrNEPS1b F	CGACAGCATCAAAGGGAGGA	<i>NEPS1b</i>		60	qPCR
NrNEPS1b R	ACCAAGGGCGACACACAG				

NrNEPS2 F	ATGAGCCAATCTGAGTCCGC	NEPS2	60	qPCR
NrNEPS2 R	ATCAATGTATCCGCCCTCG			
NrNEPS3 F	GGCTAACAATTGATGATGATGAAG	NEPS3	60	qPCR
NrNEPS3 R	CCGTACCTCACGAACATGC			
NrCOI1 F	TCCTCTATGCTCTGCTTGATACTG	COI1	60	qPCR
NrCOI1 R	TCGTGTTTCATCGGCTCCAC			
NrJAZ3 F	GTTCAATTTGTCGCCTCTATCG	JAZ3	60	qPCR
NrJAZ3 R	ACCCTCTCCTTACGCTTCTC			
NrMYC2 F	ATTCATTACCTCCCGCTTGC	MYC2	60	qPCR
NrMYC2 R	CTTCCGCTCTCTGGCTCAC			
NrMYB F	GACTGTTGAGGTGCGGGAAG	MYB	60	qPCR
NrMYB R	TCTTGAGGAGGTGCGTGTTTC			
NrYABBY5 F	GATGTGGCGGAGCAGATGT	YABBY5	60	qPCR
NrYABBY5 R	AGTCCAGAGATGGGAGCAGT			

Transkripcioni
faktori

3.4.1.8. Prečišćavanje fragmenata DNK iz agaroznog gela

Željeni fragmenti DNK umnoženi *PCR*-om, kao i plazmidi i *PCR* produkti nakon sečenja restrikcionim enzimima, prečišćavani su iz agaroznog gela nakon razdvajanja elektroforezom. Prečišćavanje je vršeno pomoću kompleta *Silica Bead Dna Gel Extraction (Fermentas, SAD)* i *GeneGet Gel Extraction Kit (ThermoScientific, Litvanija)*, po uputstvima proizvođača.

3.4.2. Heterologa ekspresija iridoid sintaza u *E. coli* i prečišćavanje rekombinantnih proteina

3.4.2.1. Bakterijski sojevi i hranjive podloge

U izradi ove disertacije korišćeni su bakterijski sojevi *E. coli Mach1* i ekspresioni sojevi *BL21(DE3)-Rosetta* i *BL21-CodonPlus (DE3)-RIL*, dobijeni ljubaznošću Prof. Dr Angelosa Kanelisa sa Aristotelovog Univerziteta u Solunu. Sojevi *BL21(DE3)* poseduju lambda *DE3* profag sa genima za T7 RNK polimerazu, koja je pod kontrolom *lacUV* promotera. Indukcija ekspresije T7 RNK polimeraze vrši se pomoću jedinjenja izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG). *LacUV* promoter je slabo osetljiv na kataboličnu represiju, zbog čega u ovom soju može doći do neindukovane ekspresije rekombinantnog proteina. Ovi sojevi ne sadrže jonsku, kao ni *OmpT* proteazu, što smanjuje degradaciju heterologih proteina ekspimiranih u ćelijama. Takođe, ovi sojevi sadrže *pACYC* plazmide, koji su rezistentni na hloramfenikol. Soj *BL21-CodonPlus (DE3)-RIL* dodatno sadrži i gen za rezistenciju na kanamicin. Bakterijski sojevi su dugoročno čuvani u glicerolskim štokovima na -80 °C. Dalja upotreba bakterijskih sojeva bi podrazumevala pravljenje subkulture presejavanjem ezom na Petri ploče sa hranjivom podlogom. Ovakve subkulture su kratkoročno čuvane na 4 °C.

Laurija-Bertani (LB) bakterijske podloge sadržale su 1% (v/v) NaCl, 1% (v/v) peptona i 0,5% (v/v) ekstrakta kvasca. Za pripremu čvrstih LB podloga ovoj mešavini dodato je 2% (v/v) agara. Podloge su autoklavirane 20 min na temperaturi od 121 °C. Antibiotici su dodati u podlogu ohlađenu na 55 °C. Po 20 ml čvrste podloge je, zatim, razliveno u sterilne plastične Petri kutije. Nakon hlađenja, podloge su čuvane na 4 °C.

3.4.2.2. Priprema hemijski kompetentnih ćelija sojeva *E. coli*

Kako bi zidovi bakterijskih ćelija postali propustljivi za ekstracelularnu DNK i proces transformacije postao efikasniji, neophodno je da ćelije budu prethodno izložene specijalnom hemijskom ili električnom tretmanu. Hemijski tretman podrazumeva pravljenje suspenzije *E. coli* u rastvoru sa viskom koncentracijom kalcijumovih jona, koji formiraju pore na bakterijskom ćelijskom zidu i čine ih propustljivijim za usvajanje strane DNK. Postupak pripreme kompetentnih ćelija *E. coli* sojeva *Mach1*, *BL21-(DE3)-Rosetta* i *BL21-CodonPlus (DE3)-RIL* započet je zasejavanjem bakterija iz glicerolskog štoka na čvrstu LB podlogu, i njihovom inkubacijom preko noći na 37 °C. Sledećeg dana inokulirano je 10 ml tečnog LB medijuma ćelijama pojedinačnih kolonija sva tri soja *E. coli*, nakon čega je startna kultura inkubirana u plastičnim falkon tubama zapremine 50 ml preko noći na 37 °C, na orbitalnoj mešalici pri brzini od 220 rpm. Potom je 250 ml LB podloge u erlenmajerima od 300 ml inokulirano sa 10 ml startne kulture, pri čemu je inkubacija nastavljena dok optička gustina bakterijske suspenzije (OD₆₀₀) nije dostigla vrednost 0,3-0,4. Merenje OD₆₀₀ vrednosti izvršeno je na spektrofotometru *HP Agilent 8453 (Agilent Technologies, Valdbron, Nemačka)*. Nakon dostizanja odgovarajuće vrednosti OD₆₀₀, dalji rast ćelija je zaustavljen hlađenjem na ledu u trajanju od 20–30 min. Zatim su ćelije prebačene u plastične falkon tube zapremine 50 ml sa koničnim dnom (*Sigma-Aldrich, Nemačka*) i centrifugirane 15 min na 3000 g na temperaturi od 4 °C. Supernatant je odliven, a talogu svake tube je dodato po 20 ml 0,1 M rastvora MgCl₂. Posle 15 min centrifugiranja na 2000 g na temperaturi od 4 °C i odlivanja supernatanta, talogu je dodato ukupno 50 ml 0,1 M CaCl₂ i suspenzije su inkubirane na ledu 20 min. Ponovljen je postupak centrifugiranja i odlivanja supernatanta, nakon čega su ćelije rastvorene u 12,5 ml rastvora koji je sadržao 85 mM CaCl₂ i 15 % glicerol (v/v). Nakon 15 min centrifugiranja na 1000 g i odstranjivanja supernatanta, talog je rastvoren u 2 ml rastvora iz prethodnog koraka i po 100 µl ovako pripremljenih ćelija je alikvotirano u mikrotube zapremine 1,5 ml. Mikrotube su trenutno zamrznute potapanjem u tečni azot i čuvane na -80 °C do upotrebe. Efikasnost transformacije i na ovaj način pripremljenih kompetentnih ćelija potvrđena je pomoću kalkulatora dostupnog na sajtu <https://www.sciencegateway.org/tools/transform.htm> i iznosila je ~10⁵–10⁶ cfu/µg.

3.4.2.3. Transformacija kompetentnih ćelija *E. coli*

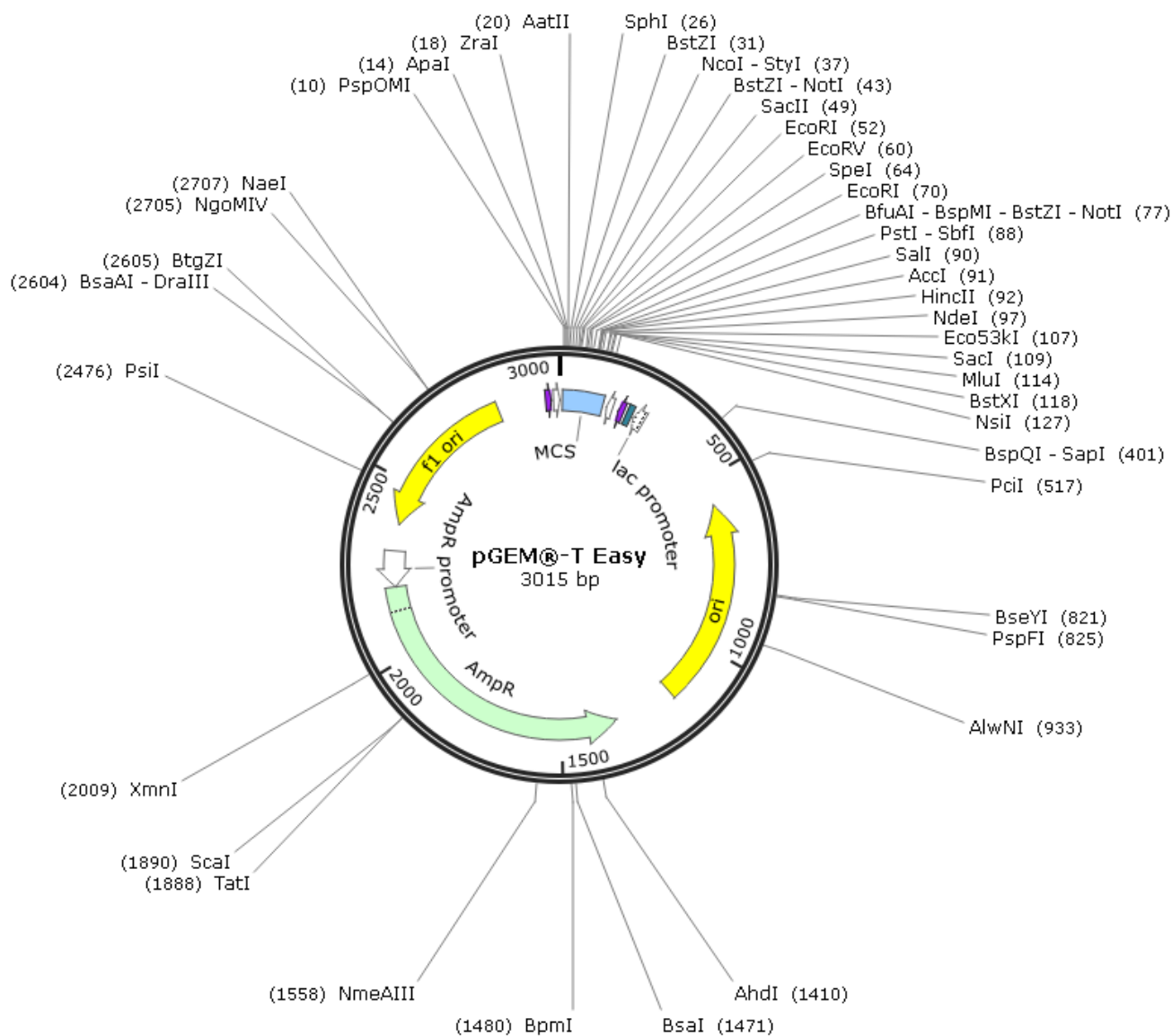
Mikrotube sa kompetentnim ćelijama držane su na ledu 15-20 min, nakon čega im je dodato 10–100 ng plazmidne DNK. Zatim je usledilo inkubiranje na ledu u trajanju od 20 min, koje je praćeno toplotnim šokom (eng. *heat shock*) u trajanju od 45 s na temperaturi od 42 °C. Toplotni šok snažno depolarizuje ćelijsku membranu kompetentnih ćelija i omogućava inkorporiranje velikih negativno naelektrisanih molekula DNK iz spoljašnje sredine. Nakon toplotnog udara ćelije su ponovo inkubirane na ledu 2 min, a zatim je u mikrotubu dodato 250 µl LB tečnog medijuma i izvršena je inkubacija ćelija na 37 °C tokom 1 h. Deo bakterijske suspenzije u zapremini od 100 µl je zasejan na jednu, a ostatak na drugu Petri kutiju sa čvrstim LB medijumom, posle čega je usledila inkubacija preko noći na 37 °C.

3.4.2.4. Plazmidni vektori

U ovoj disertaciji korišćena su tri plazmidna vektora, pri čemu su *pGEM®-T Easy* i *pTZ57R/T* vektori za kloniranje, dok je *pRSET A* ekspresioni vektor. Vektor *pRSET A* dobijen je ljubaznošću Milice Milutinović (*The Ohio State University*, Kolumbus, Ohajo, SAD).

pGEM®-T Easy

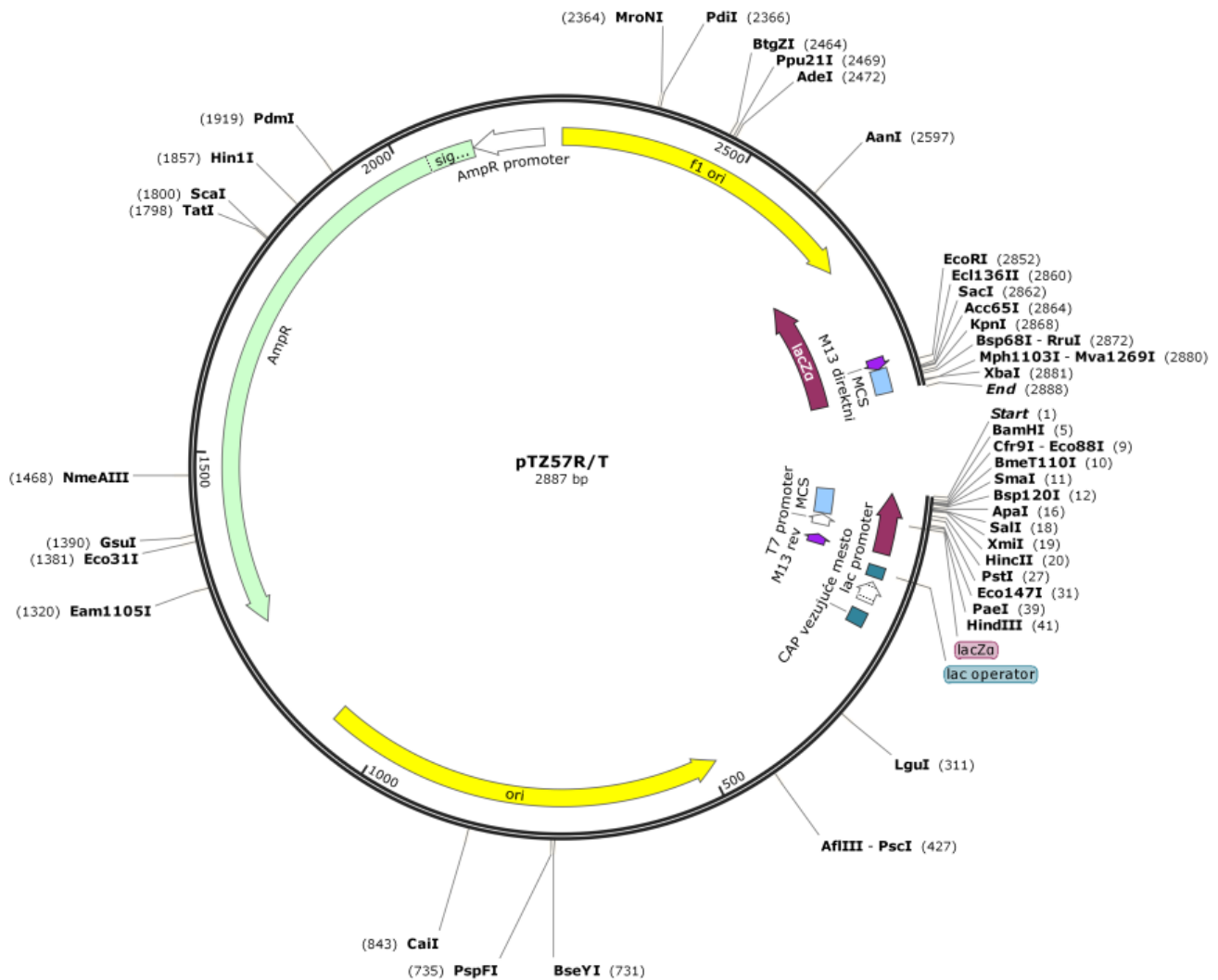
pGEM®-T Easy je linearizovani vektor za TA kloniranje sa timinskim (T) bazama na 3'-krajevima. Ovaj vektor sadrži *AmpR* gen za rezistenciju na ampicilin, kao i mesta za univerzalne M13 i T7/SP6 prajmere za sekvenciranje (**Slika 14.**). Vektor je komercijalno dostupan u okviru kompleta *pGEM®-T Easy Vector System* (*Promega GmbH*, Nemačka).



Slika 14. Mapa vektora za kloniranje *pGEM®-T Easy*

pTZ57R/T

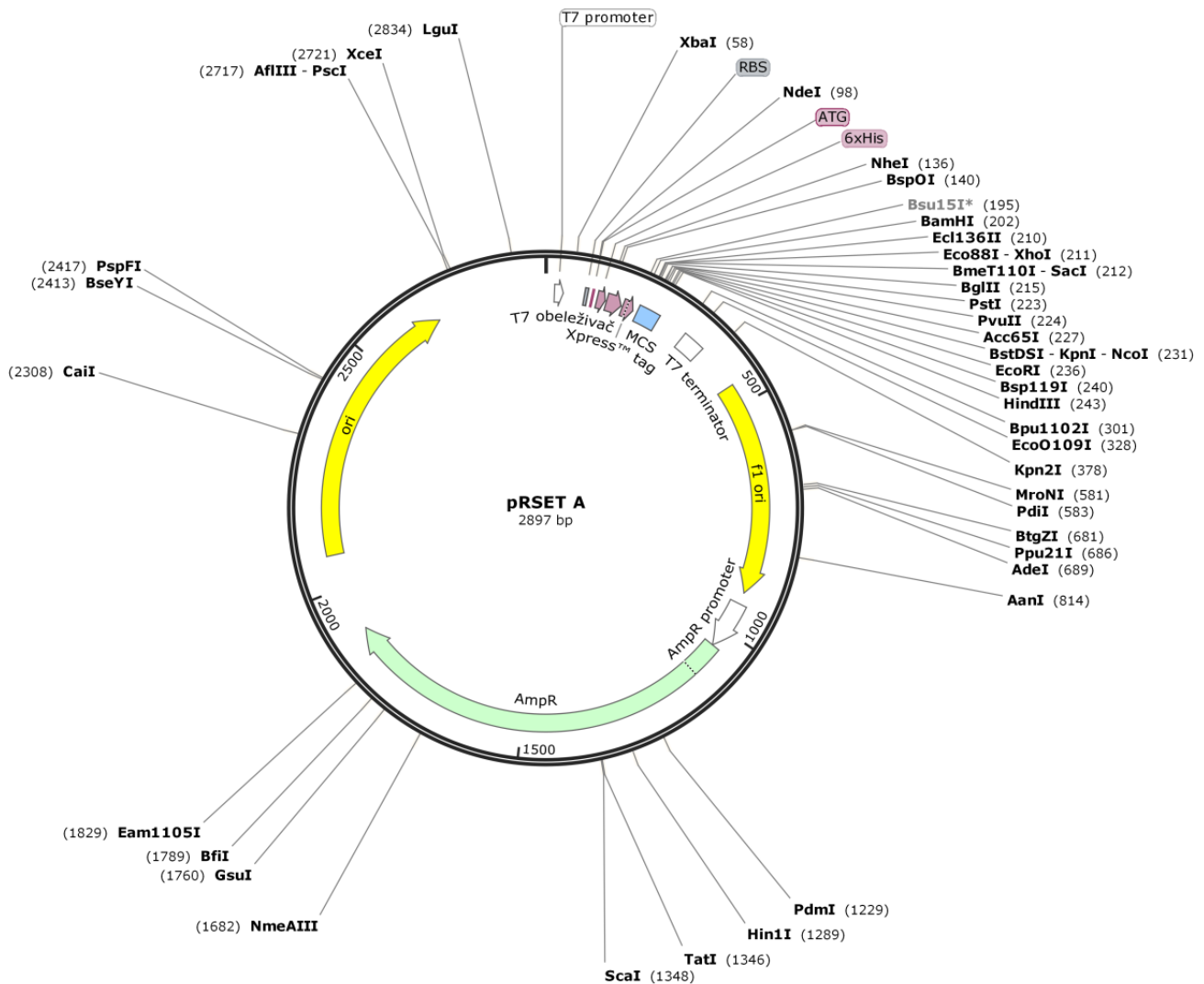
pTZ57R/T je linearizovani vektor sa 3'-ddT nastavkom za TA kloniranje *PCR* produkata komercijalno dostupan u okviru kompleta *InstAclone PCR Cloning Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, Litvanija). Ovaj vektor sadrži *AmpR* gen za rezistenciju na ampicilin, kao i mesta za univerzalne M13 prajmere ispred restrikcionog regiona (**Slika 15.**).



Slika 15. Mapa vektora za kloniranje *pTZ57R/T*

pRSET A

Vektor *pRSET A* za ekspresiju u sojevima bakterije *E. coli* (Slika 16.), sadži T7 gene za proteinsku stabilnost, N-terminalnu polihistidinsku (6 × His) etiketu za prečišćavanje rekombinantnih proteina i za imunodetekciju, kao i *AmpR* gen za otpornost na ampicilin.



Slika 16. Mapa ekspresionog vektora *pRSET A*

3.4.2.5. Kloniranje

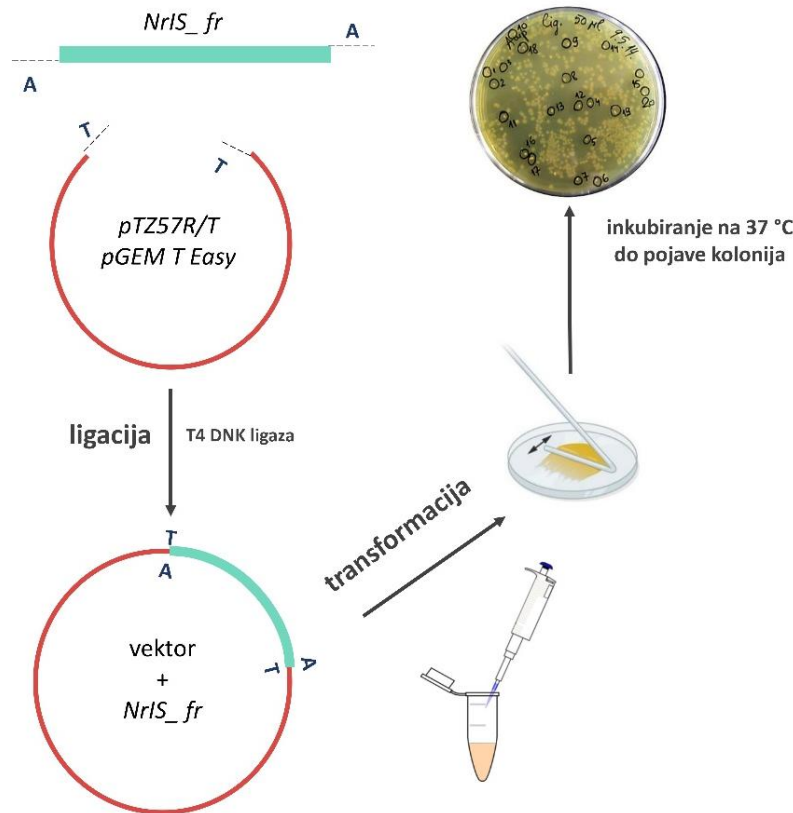
U okviru ove disertacije korišćene su tehnike TA kloniranja, kao i tradicionalnog subkloniranja baziranog na restrikcijom enzimima.

3.4.2.5.1. TA kloniranje

TA kloniranje bazira se na spajanju komplementarnih baznih parova – adenina (A), koji se dodaju aktivnošću *Taq* polimeraze na 3'-krajeve proizvoda PCR reakcije, kao i timina (T), koji se nalaze na krajevima linearizovanog vektora. Ovi bazni parovi se spajaju u reakciji ligacije, nakon čega sledi transformacija kompetentnih ćelija i njihovo umnožavanje. Budući da se ne koristi restrikcijom digestija,

ova tehnika je brža i jednostavnija od tradicionalnog subkloniranja. Za kloniranje fragmenta dobijenih amplifikacijom sa degenerativnim prajmerima korišćen je *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega GmbH, Nemačka). Ukupna zapremina reakcije je bila 10 µl i sadržala je sledeće komponente: 5 µl 2 × *Rapid Ligation Buffer*, *T4 DNA Ligase*, 1 µl *pGEM®-T Easy Vector* i ~10 ng prečišćenog *PCR* proizvoda. Nakon 1 h inkubacije reakcione smeše za ligaciju na sobnoj temperaturi, izvršena je transformacija kompetentnih ćelija *E. coli Mach1* (odjeljak 3.4.2.3.) korišćenjem 4 µl smeše za ligaciju.

Kloniranje *RACE* fragmenata i punih dužina gena kandidata za iridoid sintazu izvršeno je pomoću kompleta *InsTAclone PCR Cloning Kit* (Thermo Fisher Scientific, Litvanija). Ukupna zapremina reakcione smeše bila je 30 µl, a sastav smeše je bio sledeći: 3 µl vektor *pTZ57R/T*, 6 µl 5 × ligacioni pufer, 20–100 ng *PCR* proizvoda i 1 µl *T4 DNK* ligaze. Posle inkubacije 1 h na sobnoj temperaturi, bakterijske ćelije su transformisane sa 5 µl smeše (prema opisanom protokolu u odeljku 3.4.2.3.). Budući da *pGEM®-T Easy* i *pTZ57R/T* sadrže *AmpR* gen za rezistenciju na ampicilin, nakon transformacije selekcija *Mach1* ćelija je izvršena zasejavanjem na LB podlogu sa ampicilinom. Finalna koncentracija ampicilina je iznosila 100 µg/µl. Šematski prikaz TA kloniranja predstavljen je na **Slici 17**.



Slika 17. Postupak TA kloniranja i transformacije kompetentnih ćelija *E. coli* soja *Mach1* na primeru fragmenta gena kandidata za iridoid sintazu iz *N. rnanjensis* (*NrlS_fr*), kao inserta.

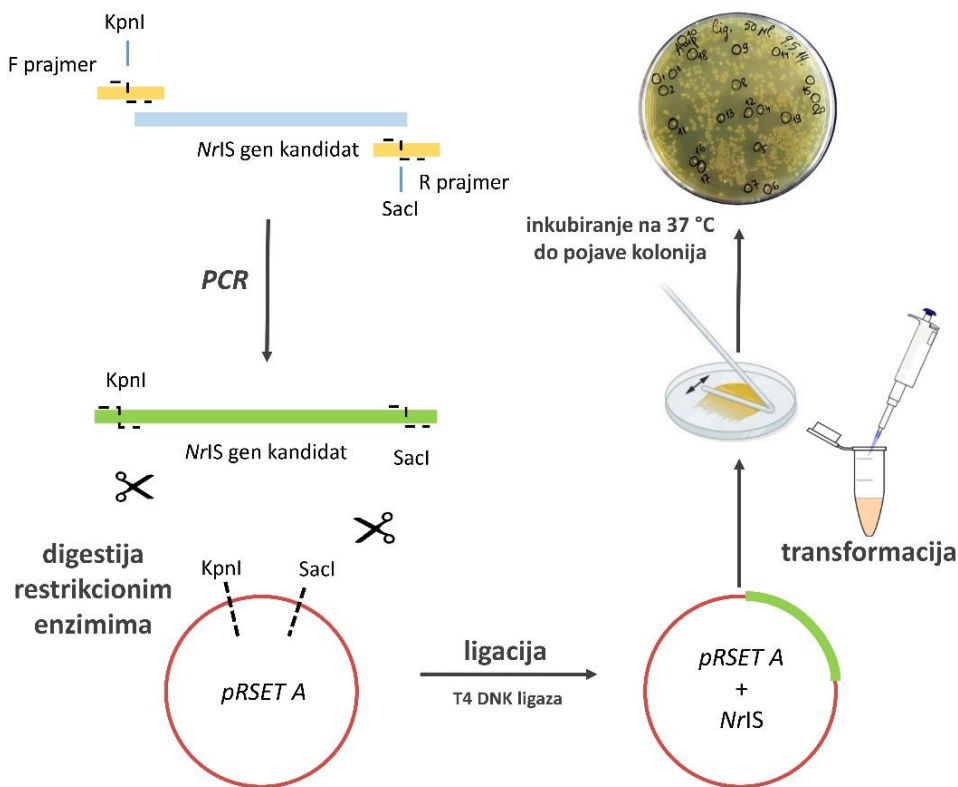
3.4.2.5.2. Kloniranje bazirano na restrikcionim enzimima

Restrikcioni enzimi su specifične endonukleaze koje prepoznaju i seku kratke palindromske sekvence dvolančane DNK, koje se nazivaju restrikciona mesta. Kada restrikcioni enzimi iseku restrikciono mesto, stvaraju se veoma reaktivni komplementarni „lepljivi krajevi” (eng. *sticky ends*) razdvojene dvolančane DNK. Kako bi se određeni vektor spojio sa fragmentom od interesa vrši se restrikciona digestija istim restrikcionim enzimima, što omogućava komplementarnim „lepljivim krajevima” vektora i fragmenta da se spoje posredstvom enzima DNK ligaze. Komercijalni vektori za

kloniranje i ekspresiju sadrže restrikcione mape sa nizom različitih restrikcionijskih mesta. S druge strane, kako bi se kloniranje odvijalo, ciljnim fragmentima se moraju dodati restrikciona mesta umnožavanjem PCR-om sa prajmerima koji sadrže sekvencu restrikcionog mesta.

Za potrebe kloniranja gena kandidata za iridoid sintazu iz nekoliko vrsta roda *Nepeta*, restrikciona digestija vektora *pRSET A*, kao i *IS* sa restrikcionijskim mestima, izvršena je enzimima *KpnI* i *SacI* (*ThermoScientific*, Litvanija). Restrikciona reakcija se sastojala od 1 µg plazmida ili 30 µl PCR produkta sa restrikcionijskim mestima, 1 × *FastDigest* reakcionog pufera i po 2 U svakog restrikcionog enzima. Reakcija se odvijala 1 h na 37 °C, a zatim je zaustavljena inkubiranjem 15 min na 65 °C. Efikasnost linearizacije vektora je proverena na agaroznom gelu, nakon čega je vektor prečišćen iz gela i kvantifikovan spektrofotometrijski za potrebe daljih koraka ligacije.

Spajanje fragmenata od interesa i vektora *pRSET A* obavljeno je pomoću DNK ligaze. Molarni odnos plazmida prema insertu bio je 1:6, a njihov unos u reakciju ligacije zapremine 30 µl izračunat je pomoću kalkulatora dostupnog na sajtu http://2011.igem.org/Team:UT_Dallas/ligation. Reakcija ligacije je sadržala 3 µl DNK ligaze (*T4 ligase*, *ThermoScientific*, Litvanija), 6 µl 5 × pufera, ~ 150 ng vektora i 300–400 ng inserta. Inkubacija je obavljena na 16 °C preko noći. Za transformaciju kompetentnih ćelija korišćeno je 5 µl reakcije (odjeljak 3.4.2.3.). Zatim su transformisane ćelije zasejane na čvrstu LB podlogu sa 50 µg/ml ampicilina, 50 µg/ml kanamicina i 17 µg/ml hloramfenikola (*BL21-CodonPlus (DE3)-RIL*) ili 100 µg/ml ampicilina i 25 µg/ml hloramfenikola (*BL21-(DE3)-Rosetta*). Nakon pojave kolonija, uspešnost kloniranja je proverena tehnikom kolonijskog PCR-a. Šematski prikaz kloniranja baziranog na restrikcionijskim enzimima je predstavljen na **Slici 18**.



Slika 18. Postupak kloniranja baziranog na restrikcionijskim enzimima na primeru gena kandidata *NriS* i transformacija kompetentnih ćelija bakterijskih sojeva za ekspresiju (*BL21-CodonPlus (DE3)-RIL* i *BL21-(DE3)-Rosetta*).

3.4.2.6. Kolonijski PCR

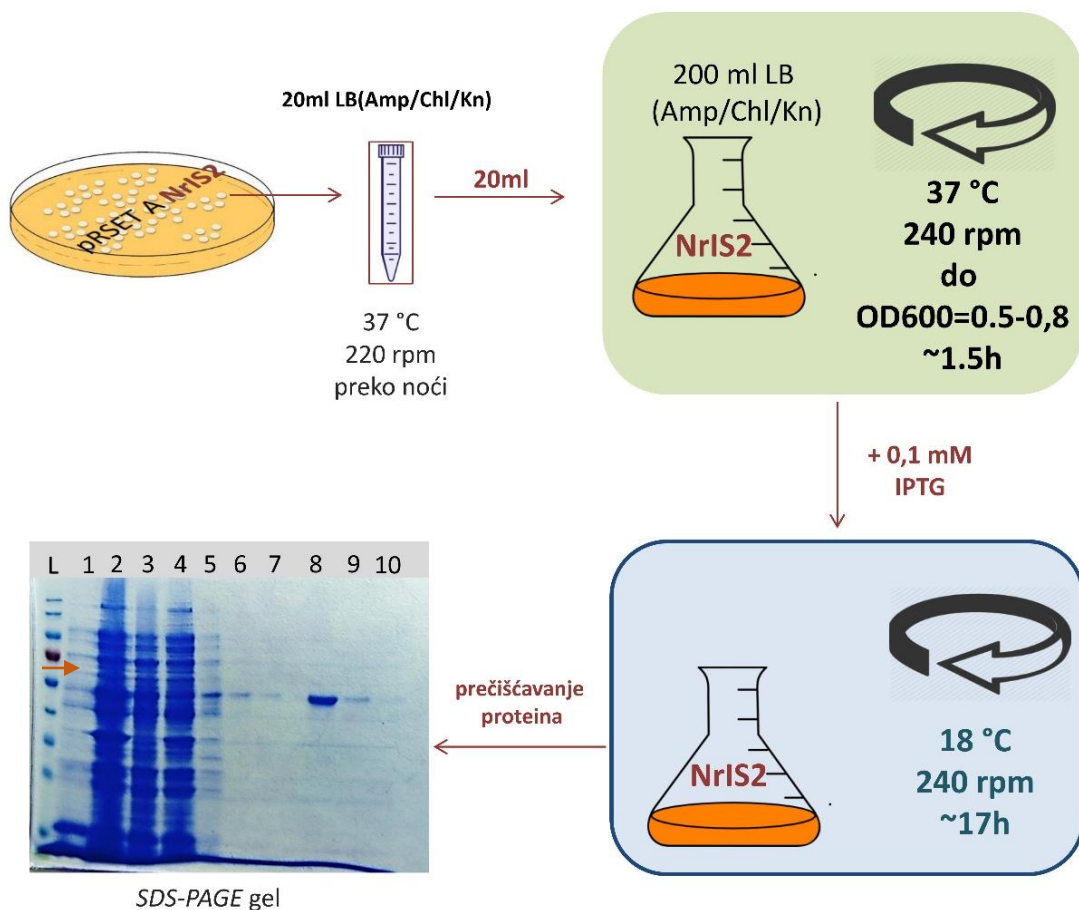
U cilju brze potvrde uspešnosti kloniranja, korišćena je tehnika kolonijskog PCR-a (eng. *colony PCR*) direktno na pojedinačnim bakterijskim kolonijama. U 20 μ l sterilne vode rasvorena je mala količina pojedinačne bakterijske kolonije u PCR mikrotubi. Od te zapremine, 8 μ l je preuzeto i korišćeno kao matrica za PCR, a ostatak je čuvan kao materijal za dalje umnožavanje bakterija i prečišćavanje plazmida nakon potvrde prisustva odgovarajućeg inserta. Kako bi se plazmidi oslobodili iz bakterijskih ćelija i bili dostupni za PCR reakciju, ćelije su lizirane inkubiranjem 3 min na 100 °C. Nakon što su ćelije „skuvane”, dodato im je po 12 μ l reakcione smeše, koja se sastojala od 10 μ l smeše *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)* (*ThermoScientific*, Litvanija) i 2 μ l smeše 10 μ M vodenog rastvora direktnog i reverznog prajmera (**Tabela 2.**) Program PCR amplifikacije bio je sledeći: 3 min na 95 °C; 30 ciklusa po 30 s na 95 °C, 30 s na 50 °C–60 °C, 1 min na 72 °C; i 7 min na 72 °C. Temperatura hibidizacije je varirala u zavisnosti od vrste i strukture prajmera.

3.4.2.7. Prečišćavanje plazmida iz bakterijskih ćelija

Ćelije kolonija u kojima je potvrđeno prisustvo inserta umnožene su gajenjem na tečnom LB medijumu sa odgovarajućom kombinacijom antibiotika na vertikalnoj rotacionoj mešalici pri brzini od 220 rpm i temperaturi od 37 °C. Zatim, prekonocna kultura je iskorišćena za izolovanje plazmida. Iz 2–5 ml prekonocne kulture plazmidi su izolovani pomoću komercijalnog kompleta *GeneElute™ Plasmid Miniprep Kit* (*Sigma-Aldrich*, Nemačka) i *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, Litvanija), po uputstvima proizvođača. Pored toga, za izolaciju plazmida *pRSET A* korišćen je metod alkalne lize. Prekonocne tečne kulture bakterija (5 ml) centrifugirane su 20 min na 3000 g, nakon čega je odliven supernatant i bakterijskim ćelijama u talogu je dodato 200 μ l pufera za formiranje suspenzije (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 μ g/ml RNaze A). Posle mešanja na vorteksu i homogenizacije suspenzije, dodato je 200 μ l pufera za liziranje bakterijskih ćelija (200 mM NaOH, 1 % SDS (v/v)), uzorci su lagano promešani invertovanjem tuba i inkubirani 3 min na sobnoj temperaturi. Zatim, dodato je 200 μ l rastvora za neutralizaciju reakcije (3 M kalijum acetat, pH 5,5). Nakon mešanja invertovanjem i centrifugiranja 10 min na 12000 g, supernatant je prebačen u novu tubu i pomešan sa 900 μ l 100 % etanola. Usledilo je mešanje invertovanjem i 20 min centrifugiranja na 12000 g. Supernatant je odliven, a talogu je dodato 100 μ l ledeno hladnog 75% etanola. Ponovljeno je centrifugiranje u trajanju od 30 s i odstranjivanje supernatanta, nakon čega su tube ostavljene otvorene 10 min u laminaru kako bi ostatak etanola ispario. Talog sa plazmidnom DNK je rastvoren u 50 μ l sterilne vode i tube su odložene na –20 °C do dalje upotrebe. Koncentracije izolovanih plazmida su proverene fluorimetrijski ili spektrofotometrijski. Restrikciono sećenje je, zatim, korišćeno i u cilju dodatnog potvrđivanja uspešnosti ligacije u izolovanim plazmidima (tzv. dijagnostička digestija).

3.4.2.8. Heterologa ekspresija gena kandidata iridoid sintaza u *E. coli*

Tečne LB podloge zapremine 200 ml, koje su sadržale 50 μ g/ml ampicilina, 50 μ g/ml kanamicina i 17 μ g/ml hloramfenikola (za soj *BL21-CodonPlus (DE3)-RIL*) ili 100 μ g/ml ampicilina i 25 μ g/ml hloramfenikola (za soj *BL21-(DE3)-Rosetta*), inokulirane su sa 20 ml prekonocne kulture transformisanih bakterija. Bakterije su, potom, gajene u Erlenmajer bocama zapremine 1 litar na temperaturi od 37 °C na horizontalnoj rotacionoj mešalici pri brzini od 240 rpm. Nakon što su vrednosti OD₆₀₀ dostigle 0,5–0,8, indukovana je ekspresija dodavanjem 0,1 mM izopropil- β -D-tiogalaktozida (IPTG) i bakterije su gajene narednih ~17 h na 18 °C na horizontalnoj mešalici pri brzini od 240 rpm. Bakterijske kulture su nakon toga podeljene u tube od 50 ml i ćelije su oborene centrifugiranjem 20 min na 2000g i čuvane na –80 °C do korišćenja. Bakterijska ekspresija *NrISI* izvršena je u ćelijama soja *BL21-(DE3)-Rosetta*, dok su ostali geni kandidati eksprimirani u *BL21-CodonPlus (DE3)-RIL*. Na **Slici 19.** je prikazana ilustracija eksperimenta.



Slika 19. Šematski prikaz postupka heterologe ekspresije gena kandidata za IS u *E.coli* sojevima *BL21-CodonPlus (DE3)-RIL* i *BL21-(DE3)-Rosetta* na primeru NrIS2. SDS-PAGE analiza prikazuje uspešnost prečišćavanja NrIS2: L – proteinski marker *Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas GmbH, Nemačka)*, 1 – uzorak pre indukcije, 2 – talog indukovanog uzorka sa insolubilnim proteinima, 3 – supernatant indukovanog uzorka sa solubilnim proteinima, 4 – proteini koji se nisu vezali za agarozu, 5 – prvo pranje, 6 – drugo pranje, 7 – treće pranje, 8 – prvo ispiranje, 9 – drugo ispiranje, 10 – treće ispiranje. Narandžasta strelica obeležava traku očekivane dužine monomera NrIS2 (~42kDa), koja je u prvom ispiranju (8) najviše zastupljena.

3.4.2.9. Prečišćavanje proteina obeleženih polihistidinskim nastavcima u nativnim uslovima

Staložene ćelije prebačene su sa $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ na led i inkubirane 15 min do odleđivanja. Zatim, dodato je 2 ml lizirajućeg pufera (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl i 10 mM imidazol, pH 8,0), 50 mg lizozima i 20 μl inhibitora proteaza i ćelije su lagano izmešane na vorteks mešalici. Usledila je inkubacija 30 min na ledu, nakon čega su ćelije podvrgnute naizmeničnom smrzavanju u tečnom azotu i otapanju, u četiri ciklusa. Suspenziji je potom dodato 25 μl RNaze A i 12,5 μl DNaze i usledila je inkubacija na ledu tokom 15 min. Zatim je dodato 10 μl Triton-X (*Sigma-Aldrich*, Nemačka), 600 μl 5M NaCl i 100 μl glicerola i izvršeno je centrifugiranje na 3000 g na temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 20 min. Pošto je *Ni-NTA* agarozna (*Qiagen*, Hilden, Nemačka) normalizovana u lizirajućem puferu, u 1 ml agaroze dodat je bakterijski lizat. Kako bi se omogućilo vezivanje polihistidinskih nastavaka za jone nikla u agarozu, izvršeno je inkubiranje suspenzije na vertikalnoj rotacionoj mešalici pri brzini od 200 rpm u trajanju od 60 min na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Agarozna je, zatim, staložena centrifugiranjem na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 5 min na 3000 rpm i supernatant je odbačen. Agarozu je dodato 6 ml pufera za ispiranje (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl i 50 mM imidazol, pH 8,0) i ispiranje se odvijalo 4 min na vertikalnoj rotacionoj mešalici, nakon čega je agarozna staložena centrifugiranjem 30 s na 3000 rpm i supernatant je odliven. Postupak ispiranja je

ponovljen tri puta. Na kraju, kako bi se proteini eluirali sa *Ni-NTA* agaroze korišćeno je 600 µl pufera za eluiranje (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl i 250 mM imidazol, pH 10,2) uz mešanje uzoraka 10 min na vertikalnoj rotacionoj mešalici. Supernatantu je, zatim, dodato 100 µl glicerola i eluenti su čuvani na – 80 °C do korišćenja. Po 20 µl alikvota svakog pojedinačnog koraka tokom postupka izolacije proteina analizirano je *SDS PAGE* metodom (**Slika 19.**)

3.4.2.10. *SDS-PAGE* elektroforeza i bojenje proteina pomoću *Coomassie blue* reagensa

Nakon prečišćavanja proteina pomoću *Ni-NTA* agaroze, uzorcima je dodat pufer za uzorke u odnosu 1:1 (v:v) (*Laemmli*, 1970). Sadržaj pufera za uzorke je prikazan u **Tabeli 3.** Uzorci su inkubirani 5 min na 95 °C u vodenom kupatilu, nakon čega su smešteni na led do hlađenja na 4 °C, i centrifugirani 3 min na 12000 g. Pomoću denaturišuće *SDS-PAGE* elektroforeze na sistemu *Mini-Protein II* (*Bio-Rad*, *SAD*) izvršeno je razdvajanje proteina po veličini. Razdvajanje se odvijalo 120 minuta na 200 V. Finalna koncentracija akrilamida u gelu za razdvajanje iznosila je 10% (v:v), dok je u gelu za koncentrovanje bila 5% (v:v) (**Tabela 3.**) Molekulska masa proteina određivana je na osnovu komercijalnih proteinskih markera *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (*Fermentas GmbH*, Nemačka). Isti set uzoraka je paralelno razdvajan na dva gela, nakon čega je jedan korišćen za bojenje ukupnih proteina u uzorcima, a drugi je upotrebljen za *Immuno blotting* analizu. Proteini na gelu su obojeni inkubiranjem u rastvoru boje *Coomassie Blue* tokom 45 min na sobnoj temperaturi, uz blago mešanje na klackalici. Nakon toga, gel je obezbojavan preko noći na sobnoj temperaturi u rastvoru *PDS* (eng. *Protein Destaining Solution*), čiji je sastav prikazan u **Tabeli 3.**

3.4.2.11. Imunodetekcija proteina (eng. *Immuno blotting*)

Proteini su sa 10% poliakrilamidnog gela prebačeni na nitroceluloznu membranu (*Bio-Rad*, *SAD*) putem elektrotransfera (*Mini Trans-Blot Module*, *Biorad*, *SAD*) tokom 90 min na 60 V u puferu za transfer (**Tabela 3.**). Blotovane membrane su inkubirane preko noći na 4 °C u 10% rastvoru nemasnog mleka u prahu (eng. *nonfat dry milk*, *NFDM*; *Nestle*, *SAD*) u T-PBS puferu (**Tabela 3.**).

Tabela 3. Sadržaj pufera korišćenih u metodama detekcije rekombinantnih proteina

<u>Pufer za uzorke</u>	62nM Tris-HCl (pH 6,8)	2,5% Bromphenol blue	2% SDS	10% glicerol	0,5% β-merkaptotanol
<u>Sastav razdvajajućeg SDS gela</u>	0,375 M Tris-HCl (pH 8.8)	10% Akrilamid/Bis	0,1% APS	0,1% TEMED	0,1% SDS
<u>Sastav koncentrujućeg SDS gela</u>	0,125 M Tris-HCl (pH 6.8)	5% Akrilamid/Bis	0,1% APS	0,1% TEMED	0,1% SDS
<u>PDS</u>	15% metanol	7% glacijalna sirćetna kiselina			
<u>Pufer za transfer</u>	25mM Tris-HCl (pH 8,3)	192 mM glicin			
<u>T-PBS</u>	80g/l NaCl	2 g/l KCl	37,2 g/l Na ₂ HPO ₄ x1 2H ₂ O	2,4 g/l KH ₂ PO ₄	0,05% Tween-20
<u>ECL smeša</u>	0,2 mM p-kumarna kiselina	1,25 mM Luminol	30% H ₂ O ₂	100 mM Tris-HCl	

Membrane su narednog dana inkubirane 2h na sobnoj temperaturi, uz blago klackanje, u 1:500 (v:v) rastvoru primarnih antitela, His-probe (H-3, sc-8036, *Santa Cruz Biotechnology*, SAD) u 5% rastvoru *NFDM* u T-PBS puferu (v:v). Membrane su zatim ispirane u T-PBS puferu (dva puta po 1 min, jedanput 15 min i tri puta po 5 min) i inkubirane 2h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim antitelom *Goat Anti-Mouse IgG-HPR* (*Agrisera Antibodies*, Švedska) rastvorenim u odnosu 1 : 5000 (v:v) u 10%-tnom rastvoru *NFDM* u T-PBS puferu. Detekcija proteina je urađena metodom pojačane hemiluminiscencije (eng. *Enhanced ChemiLuminescence, ECL*), tako što su membrane inkubirane 5 min u 12 ml *ECL* smeše (**Tabela 3.**). Membrane su bile izložene filmu (*Kodak X-Omat LS, Sigma-Aldrich*, SAD) u trajanju od 2 minuta, koji je potom fiksiran i razvijen.

3.4.3. Funkcionalna karakterizacija iridoid sintaza iz nekoliko vrsta roda *Nepeta*

3.4.3.1. *In vitro* enzimski esej za potvrdu funkcije iridoid sintaza

Aktivnost prečišćenih gena kandidata iridoid sintaze testirana je na osnovu potrošnje pretpostavljenog supstrata (8-oksogeranial) i formiranja proizvoda reakcije (nepetalaktol). Enzimski esej sadržao je 50 mM MOPS (3-(N-morfolino) propansulfonska kiselina), 100 mM NaCl, 1 mM NADPH, 500 μ M 8-oksogeranial (*Santa Cruz Biotechnology*, SAD) i 2,5-5 mg rekombinantne IS. Reakcija je inkubirana preko noći na 30 °C, nakon čega je stopirana sa 1:1 (v:v) heksana, a ekstrakcija je izvršena intenzivnim mešanjem na vorteks mešalici 3 puta po 30 s. Zatim je centrifugiranjem u trajanju od 2 min pri brzini od 6000 rpm izdvojena gornja organska faza koja je prečišćena filtriranjem kroz 0,2 μ m špic filter (*Agilent Technologies*, SAD) i čuvana na 4 °C do GC/MS analiza.

3.4.3.2. Analiza produkata enzimske reakcije gasnom hromatografijom sa masenom detekcijom (GC-MS)

Gasna hromatografija sa masenom detekcijom (GC-MS) korišćena je za analizu produkata reakcije nakon enzimskih eseja za potvrdu funkcija iridoid sintaza. Korišćen je gasni hromatograf *Shimadzu QP2010 plus GC-MS* sistem (*Shimadzu*, Kjoto, Japan), koji je povezan sa autoinjektorom AOC-5000 (*Shimadzu*, Kjoto, Japan). Hromatografsko razdvajanje rađeno je na koloni ZB-5 MS dimenzija 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m (*Phenomenex*, Austrija). Obrada podataka i kontrola GC-MS sistema vršena je pomoću softvera „*Lab solution*” (*Shimadzu Inc.*, Kjoto, Japan). Kao standardi korišćeni su rastvori 8-oksogeranijala (*Santa Cruz Biotechnology*, Dalas, Teksas, SAD) i *cis,trans*-nepetalaktola u koncentraciji 1 mg/ml n-heksana (*Sigma – Aldrich*, St. Louis, MO, SAD). Injektovano je 1 μ l standarda ili ekstrakta enzimske reakcije. Hromatografski uslovi su bili podešeni na sledeće parametre: temperaturni gradijent 50–240 °C (u koracima od 5 °C po min); temperatura injektora 200 °C, injektovanje u modu bez razdvajanja (eng. *splitless mod*), temperatura jonskog izvora 280 °C. Mobilna faza/noseći gas bio je He (99,999%) (*The Linde Group*, Irska) protoka 1,6 ml/min. Rađena je elektronska jonizacija u pozitivnom modu na +70eV. Mase su skenirane u opsegu od 40 do 400 amu (engl. *atomic mass unit*) (*SCAN mode*), dok je istovremeno praćen doprinos karakterističnih pojedinih masa (engl. *Single Ion Monitoring mode, SIM*) koje odgovaraju 8-oksogeranialu (166) i nepetalaktolu (168). Identifikacija jedinjenja je izvršena poređenjem sa standardima, kao i upotrebom biblioteka masa *Wiley8, NIST05* i *FFNSCI*.

3.4.3.3. NMR analiza produkata enzimske reakcije

Za potvrdu strukture odgovarajućih produkata enzimske *in vitro* reakcije korišćene su ^1H , kao i 2D H–H *COSY* NMR spektroskopska tehnika. Kako bi se dodatno potvrdile strukture, snimljeni su i spektri 8-oksogeraniala i *cis,trans*-nepetalaktola. Hemijska pomeranja su izražena u δ jedinicama, a konstante sprežanja (J) u Hz. Za NMR spektroskopska merenja upotrebljen je Brukerov spektrometar *AVANCE III* radne frekvencije 500,26 MHz za ^1H i probom širokog propusnog opsega (eng. *Broad bend*,

BBO) sa prečnikom kiveta od 5mm. Uzorci su rastvoreni u 99,8% CDCL₃ (*Sigma-Aldrich*, Nemačka) sa 0,03% TMS (v/v). Brukerov program *TopSpin* (verzija 3.9.b.91p17) je korišćen za snimanje i obradu spektara.

Za potrebe snimanja ¹H NMR spektara 32768 tačaka je prikupljeno koristeći standardni pulsni program „zg30” sa 128 skeniranja. Spektralna širina je podešena na 20 ppm (10005,2 Hz), vreme relaksacije 2 s (d1), vreme akvizicije 2 s, a položaj transmitera na 8.5 ppm. Kao referentni signal je korišćen interni standard trimetilsilan (TMS, δ=0 ppm). Ukupno vreme snimanja je oko 10 min. Prilikom snimanja 2D H–H *COSY* NMR spektara, spektralna širina je kao i kod ¹H NMR spektara bila 5502,8 Hz po F1 i po F2, vreme relaksacije 2 s. Spektri su snimani sa 32 skeniranja po svakom od 256 inkremenata po F1 sa FID-om od 2048 tačaka po F2. Položaja transmitera je 5 ppm u obe frekventne ose. Ukupno vreme trajanje analize je oko 90 min.

3.4.3.4. Uporedna analiza ekspresije funkcionalno okarakterisanih iridoid sintaza i profilisanje iridoida u različitim organima vrsta roda *Nepeta*

3.4.3.4.1. Biljni materijal

Polazni biljni materijal za ovaj eksperiment bile su biljke *N. rtanjensis*, *N. nervosa* i *N. sibirica* iz kulture *in vitro*. U odeljku 3.3.2. je opisan postupak uspostavljanja i održavanja *in vitro* kulture vrsta roda *Nepeta*. Kod svake vrste su uzorkovani koren, stablo i listovi od jedinki istog klona, uniformne starosti. Pri tom, sakupljena su tri biološka ponavljanja, dok je grupa od 8–10 jedinki predstavljala jedno biološko ponavljanje. Nakon uzorkovanja je biljni materijal čuvan na -80 °C do dalje upotrebe.

3.4.3.4.2. Izolacija RNK i kvantitativni PCR u realnom vremenu (RT-qPCR)

Protokol izolacije RNK u ovom eksperimentu izvršen je pomoću izmenjene metode opisane u radu Gasic i sar. (2004), kako je prethodno opisano u odeljku 3.3.6. Na osnovu sekvenci *NrIS2*, *NnIS* i *NsIS* konstruisani su visoko specifični prajmeri za *qPCR*. Postupak reverzne transkripcije je opisan u odeljku 3.2.2. *RT-qPCR* analiza urađena je pomoću uređaja *QuantStudio® 3 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD*). Uslovi amplifikacije su opisani u odeljku 3.2.5. Kao endogena kontrola korišćen je gen kandidat za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (*GAPDH*). Isti set prajmera, koji je dizajniran na osnovu sekvence iz transkriptoma *N. rtanjensis*, korišćen je i za amplifikaciju *GAPDH* u tkivima *N. sibirica* i *N. nervosa*.

3.4.3.4.3. UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS analiza sadržaja nepetalaktona

Analiza sadržaja dominantnih iridoida u korenovima, stablima i listovima *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* izvršena je kako je opisano u odeljku 3.1.9.

3.4.3.5. Filogenetska analiza

Višestruko poravnanje sekvenci izvršeno je pomoću programa *Clustal W* iz softverskog paketa *MEGA* verzija 6.0. Za trimovanje divergentnih regiona višestrukog poravnanja sekvenci i dobijanje visoko konzerviranih blokova, korišćen je program *Gblocks* verzija 0.91b. Filogenetska analiza konzerviranog bloka višestrukog poravnanja sekvenci izvršena je pomoću metode najveće verovatnoće (eng. *maximum likelihood*) u programu *MEGA* 6.0 sa 1000 butstrap (eng. *bootstrap*) permutacija. Identifikacioni brojevi sekvenci korišćenih za filogenetsku analizu prikazani su u Prilogu u **Tabeli P1**.

3.4.3.6. 3D modelovanje funkcionalno okarakterisanih iridoid sintaza

Početne 3D strukture enzima su dobijene homolognim modelovanjem korišćenjem programa *MODELLER* (*Yang* i sar., 2012.), a potom je urađeno *Rosetta all-atom* modelovanje (*Alford* i sar., 2017). Ukupno je generisano po 5000 izmodelovanih struktura za svaki enzim. Više informacija o konformacionom prostoru koje zauzimaju izmodelovane strukture dobijeno je grupisanjem, odnosno klasterovanjem, prema strukturnoj sličnosti.

3.5. Analiza bioloških aktivnosti ekstrakata listova odabranih vrsta roda *Nepeta*

3.5.1. Priprema ekstrakata listova *Nepeta rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* i čistih jedinjenja

Ekstrakti listova *Nepeta rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*, gajenih u uslovima *in vitro*, pripremljeni su rastvaranjem 1g biljnog materijala sprasšenog u tečnom azotu u 5 ml metanola. Ekstrakcija je izvršena u ultrazvučnom kupatilu (*Sonorex, Bandelin*, Berlin, Nemačka) u trajanju od 10 minuta. Nakon 15 minuta centrifugiranja na 10000 g, uzorci su profiltrirani kroz 0,2 µm celulozne filtere (*Agilent Technologies*, Santa Klara, SAD). Metanolni ekstrakti su potom koncentrovani na 30 °C u vakuum uparivaču (*Eppendorf Concentrator 5301*, Hamburg, Nemačka) do suve mase i rastvoreni u 30% etanolu u koncentraciji 10 mg/ml. Standardi *trans,cis*-nepetalaktona, *cis,trans*-nepetalaktona, dehidronepetalaktona, epideoksiloganinske kiseline i ruzmarinske kiseline (*Sigma-Aldrich*, Nemačka) rastvoreni su u 30% etanolu u finalnoj koncentraciji od 4 mg/ml. Za potrebe *UHPLC/(±)HESI-MS²* kvantifikacije iridoida i fenola, ekstrakti su nakon uparavanja rastvoreni u 96% metanolu (w:v=1:10) i profiltrirani kroz celulozne filtere dimenzije pora 0,2 µm.

3.5.2. *UHPLC/(±)HESI-MS/MS* metaboličko profilisanje iridoida i fenola u metanolnim ekstraktima listova *Nepeta rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*

Postupak za analizu sadržaja dominantnih iridoida u metanolnim ekstraktima listova *Nepeta rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* opisan je u odeljku 3.1.9. Modifikacija analitičke metode se ogleda u tome da je kvantifikacija iridoidnih glukozida u negativnom modu masenog spektrometra rađena simultano sa kvantifikacijom iridoidnih aglikona u pozitivnom modu. Za kvantifikaciju epideoksiloganinske kiseline, *cis,trans*-NL, *trans,cis*-NL i DNL, korišćene su kalibracione krive standarda, koje su pokazale dobru linearnost.

Kvantifikacija fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima listova dve vrste roda *Nepeta* urađena je na masenom spektrometru opisanom u odeljku 3.1.9. *Synchronis C18* kolona (100 × 2.1 mm) sa veličinom čestica od 1.7 µm (*Thermo Fisher Scientific, USA*), termostatirana na 40 °C, korišćena je za hromatografsko odvajanje. Brzina protoka mobilne faze, koja se sastojala od 0,1% mravlje kiseline u vodi (A) i acetonitrila *MS* čistoće (B), bio je podešen na 0,3 ml/min. Eluiranje jedinjenja bilo je u reverzno-faznom režimu sa gradijentnim programom prema Mišić i sar. (2015). Injekciona zapremina bila je 10 µl.

Temperatura jonske probe masenog spektrometra bila je podešena na 450 °C, temperatura kapilare 320 °C. Voltaže speja i sočiva bile su 4 i 0 kV, a pritisci nosećeg gasa, gasa u jonskom izvoru i auksilarnog gasa (N₂) 50, 0 i 20 AU, redom. Maseni spektri snimani su u negativnom modu, dok je fragmentacija izazvana pomoću argona kao kolizionog gasa. *SRM* metoda korišćena je za kvantifikaciju ciljanih jedinjenja u uzorcima (Božunović i sar., 2018).

Identifikacija fenolnih jedinjenja u uzorcima izvedena je upoređivanjem njihovih *MS*, *MS²*, *UV* spektara i retencionih vremena sa autentičnim standardima, kao i pretraživanjem literature. Osnovni standardni rastvori su pripremljeni rastvaranjem 1 mg svakog čistog jedinjenja u 1 ml metanola. Radne standardne smeše su pripremljene rastvaranjem osnovnog rastvora čistih jedinjenja da bi se dobila koncentracija od 100 µg/ml, i drugi nivoi kalibracije su dobijeni razblaživanjem rastvora metanolom. Radni standardni rastvori su pripremljeni na 15 kalibracionih nivoa, u rasponu koncentracija od 100 µg/ml do 0,001 µg/ml. Regresija je izračunata za svaku od kalibracionih kriva i sve su pokazale dobru linearnost sa koeficijentima korelacije između $r = 0.990$ i 0.999 , $p < 0.001$. Ukupna količina svakog ciljanog jedinjenja u uzorcima određena je izračunavanjem integrala površine pika i izražena je kao µg/100 mg suvog ekstrakta (SE). Standardi fenolnih kiselina i flavonoida (čistoće preko 95%) nabavljeni od firme *Sigma Aldrich*, Štanhajm, Nemačka.

3.5.3. Antimikrobno dejstvo

3.5.3.1. Testirani mikroorganizmi

Testirane su sledeće vrste bakterija: *Bacillus cereus* (klinički izolat), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Echerichia coli* (ATCC 35210) i *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311). U ovoj disertaciji korišćeni su sledeći sojevi mikromiceta: *Aspergillus fumigatus* (klinički izolat), *A. ochraceus* (ATCC 12066), *A. versicolor* (ATCC 11730), *A. niger* (ATCC 6257), *Penicillium funiculosum* (ATCC 11797), *P. ochrochloron* (ATCC 9112) i *P. verrucosum* var. *cyclopium* (izolat iz hrane). Korišćeni sojevi mikroorganizama deponovani su u laboratoriji za Mikologiju, Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju.

3.5.3.2. Referentni antibiotici i antimikotici

Kao referentni antibiotik korišćen je streptomycin u koncentraciji 1 mg/ml *DMSO* (P7794, *Sigma-Aldrich*, Nemačka). Kao referentni antimikotik, korišćena je supstanca ketokonazol, rastvoren u koncentraciji 1 mg/ml *DMSO* (Hemofarm koncern A.D., Vršac, Srbija). Streptomycin i ketokonazol korišćeni su kao pozitivna antimikrobna kontrola (u opsegu koncentracija 1–3500 µg/ml), dok je rastvor 5% *DMSO* predstavljao negativnu kontrolu.

3.5.3.3. Priprema mikrobnih sojeva i mikrodiluciona metoda

Mikrodiluciona metoda, 96- sistem (*Hänel i Raether*, 1988; *Daouk i sar.*, 1995), korišćena je za ispitivanje *in vitro* antimikrobne aktivnosti ekstrakata dve vrste roda *Nepeta*, kao i njihovih glavnih komponenti, i testirano je navedenih osam vrsta bakterija i osam vrsta gljiva.

Bakterijski sojevi su gajeni na *TSB* podlozi (eng. *Tryptic Soy Broth*, *Biolife*, Italija), koja sadrži 30 g/l triptik soje. Na 2 ml sterilne *TBS* hranljive podloge sterilnom špatulom su zasejani bakterijski sojevi, koje su zatim, zajedno sa kontrolnim *TBS* epruvetama inkubirane u termostatu na 37 °C tokom 24 h. Po 100 µl prekonoćne kulture, sa približno 1×10^9 ćelija po ml, sipano je u mikrotube sa 900 µl hranljive podloge i tako je dobijena koncentracija 1×10^8 ćelija po ml. Na isti način, daljim serijskim razblaženjima dobijene su suspenzije bakterijskih ćelija željenih koncentracija. Koncentracija bakterijske suspenzije od 1×10^6 ćelija po ml je bila upotrebljena za mikrodilucionu metodu i testiranje antibakterijske aktivnosti.

Kultura mikromiceta gajena je na *MA* (eng. *Malt-Agar*) hranljivoj podlozi (15 g/l agara, 50 g/l ekstrakta slada, pH vrednost 7). Podloge su pre upotrebe sterilisane u autoklavu tokom 25 minuta na 121 °C. Navedeni sojevi mikromiceta su gajeni na ovim podlogama 21 dan na 26 °C, nakon čega su spore spirane sa površine medijuma kako bi se pripremio inokulum. Za spiranje spora korišćen je sterilni 0,85% rastvor NaCl sa 0,1% *Tween* 80 (v:v), kojim je napravljena konačna koncentracija suspenzije od 1×10^5 ćelija po ml medijuma. Ovako pripremljene suspenzije inokulirane su na čvrstu *MA* podlogu, radi potvrde validnosti inokuluma, kao i odsustva kontaminacije.

Na mikrotitracione ploče sa inokuliranim bakterijama i mikromicetama u tečnom medijumu, dodavana su serijska razblaženja biljnih ekstrakata, standarda iridoida i ruzmarinske kiseline, kao i referentnih jedinjenja. Mikrotitracione ploče sa bakterijama inkubirane su tokom 48 h na 37 °C, dok su ploče sa inokulumima mikromiceta ostavljene 72 h na 28 °C. Minimalna inhibitorna koncentracija (*MIC*) određivana je kao najmanja koncentracija na kojoj nije bilo vidljivog rasta mikroorganizama. Minimalne baktericidne koncentracije (*MBC*) i minimalne fungicidne koncentracije (*MFC*) potvrđivane su kada je po 2 µl medijuma, iz bunarića na kojima je definisana *MIC*, reinokulisano u 100 µl svežeg tečnog medijuma. U slučajevima kada je nakon 24 h inkubiranja bakterija na 37 °C, odnosno nakon 72 h

inkubacije gljiva na 28 °C, rast mikroorganizama izostao, te vrednosti koncentracija ekstrakata ili čistih jedinjenja uzimale su se kao *MBC* ili *MFC* vrednosti (Tsukatani i sar., 2012). Zatim, u bunariće mikrotitracione ploče dodato je po 40 µl boje p-jodonitrotetrazolijum violet (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolijum hlorid) (*Sigma-Aldrich*, Nemačka) u koncentraciji 2 mg/ml i izvršeno je inkubiranje u trajanju od 2 h na 37 °C. Kontrolna polja bez testiranih razblaženja su ljubičaste boje, dok je nedostatak boje rezultat mikrobiocidnog dejstva, a blede obojena polja ukazuju na mikrobiostatičko dejstvo.

3.5.4. Imunomodulacijsko dejstvo

3.5.4.1. Izolacija makrofaga iz ćelija pacova

Peritonealne ćelije su izolovane iz ženki pacova soja *Dark Aguti (DA)*, čija je starosti bila 2–3 meseca. Životinje su dobijene iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Eksperimenti su odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu (Br. 2-10/15). Za izolaciju makrofaga je korišćen *PBS* puffer (eng. *Phosphate Buffered Saline*), napravljen od 2,7 mM KCl, 1,76 mM KH₂PO₄ (*LachNer*, Neratovice, Češka), 137 mM NaCl (NaCl 0,9%, Hemofarm A.D. Beograd, Srbija) i 8,1 mM Na₂HPO₄ × 2 H₂O, pH = 7,4. *RPMI-1640* medijum se sastojao od 25 mM HEPES i 2 mM L glutamina (*Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek*, Izrael), uz dodata *Pen/Strep* koktela antibiotika *Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek*, Izrael) i gentamicina (Galenika, Beograd, Srbija). Serum fetusa govečeta (eng. *Fetal Calf Serum – FCS; PAA Laboratories*, Pašing, Austrija) je pre upotrebe inkubiran 30 min na 56 °C, kako bi se inaktivirale komponente komplemena.

Ćelije peritonealnog ispirka su izolovane ubrizgavanjem 10 ml sterilnog hladnog *PBS* pufera u peritonealnu šupljinu pacova i sakupljanjem peritonealne tečnosti u sterilne epruvete. Zatim je peritonealni ispirak centrifugiran pri brzini od 500 g na 3 min i supernatant je odbačen. Nakon toga su ćelije rastvorene u *RPMI-1640* 5% *FCS*, kvantifikovane i postavljene u koncentraciji od 2×10^6 ćelija po bunaru u ploču od 24 bunara. Potom je ploča inkubirana u trajanju od 2 h na 37 °C u inkubatoru sa vlažnom atmosferom (pri koncentraciji CO₂ od 5%), kako bi došlo do adhezije peritonealnih makrofaga za dno bunara ploče. Nakon toga, bunari su isprani sa 2×1 ml *PBS*, kako bi se odstranile ćelije koje se nisu zalepile. Dobijene ćelije, koje su adherirale za podlogu, iskorišćene su za dobijanje populacije peritonealnih makrofaga. Zatim, ćelije su stimulisane sa 10 ng/ml lipopolisaharida (*LPS, Sigma-Aldrich*, Nemačka) i tretirane različitim koncentracijama metanolnih ekstrakata listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* (0, 50, 100, 250 i 500 µg/ml), kao i *trans,cis-NL* i *cis,trans-NL* (0, 10, 25, 50 i 100 µg/ml).

3.5.4.2. Merenje produkcije citokina metodom ELISA

Koncentracije citokina u supernatantima ćelijskih kultura su određene pomoću testa *ELISA*. Za merenje koncentracija odgovarajućih citokina korišćene su mikrotitar ploče *MaxiSorp* sa 96 bunarića (*Nunc*, Danska), kao i komercijalni parovi antitela: *IL-6*, *TNF* i *IL-1β* (*eBioscience Inc*, SAD). Bunarići su prvo bili obloženi odgovarajućim primarnim antitelom (50 µl po bunariću), koja su rastvorena u *PBS* puferu prema uputstvu proizvođača, a zatim su ploče inkubirane preko noći. Nakon inkubacije, ploče su tri puta isprane 0,05% rastvorom *Tween 20* u *PBS* (*TPBS*). Nespecifično vezivanje antitela za ploču je blokirano rasvorom *PBS* 10% *FCS* (za *IL-6* i *TNF*), odnosno *PBS* 1% *BSA* (za *IL-1β*). Zatim je naneto po 50 µl uzoraka i standarda u bunariće i ploče su inkubirane na sobnoj tempereturi 2h. Usledilo je ponovno ispiranje rastvorom *TPBS* i dodavanje sekundarnog antitela obeleženog biotinom odgovarajućeg razblaženja u odgovarajućem rastvoru za blokiranje. Nakon 1 h inkubiranja, ploče su isprane rastvorom *TPBS* i dodat je rastvor avidina konjugovanog sa peroksidazom iz rena (avidin-*HRP*,

od eng. *Horse Radish Peroxidase*). Usledilo je inkubiranje u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi i ploče su ponovo isprane tri puta rastvorom *TPBS*. Nakon toga, dodato je po 50 µl rastvora za peroksidazu (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, *eBioscience Inc*, SAD). Po razvijanju boje reakcija je prekidana sa 50 µl 1M HCl. Zatim je merena apsorbanacija pomoću spektrofotometra (*Titertek*, Nemačka) na 450 nm. Donji limit detekcije je bila koncentracija 30 pg/ml, dok je gornji bio 10 ng/ml. Koncentracija citokina (ng/ml) određivana je korišćenjem standardne prave dobijene na osnovu vrednosti apsorbanacije za rekombinantni citokin, koji je prethodno serijski razblažen.

3.5.4.3. Merenje nivoa fagocitoze

Nivo fagocitoze je određen u makrofagima metodom protočne citofluorimetrije. Fluorescentno obeležene kuglice za fagocitozu su preopsonizovane u 50% *FCS PBS* u trajanju od 1 h na temperaturi od 37 °C. U preporučenom razblaženju, 500 µl rastvora kuglica je naneto preko makrofaga (1×10^5 po bunariću), koji su bili u kulturi 24h sa *LPS*. Nakon toga je usledila inkubacija 1 h na 37 °C. Zatim je rastvor odstranjen, ćelije su isprane 2×1 ml *PBS* i dodato je po 300 µl duplo razblaženog radnog rastvora tripan plavog (eng. *Trypan Blue – TB*, *BDSL*, Velika Britanija). Nakon što je *TB* odliven, ćelije su ispirane 2×1 ml *PBS*, skinute sa podloge, centrifugirane 3 min pri brzini od 500 g, finalno resuspendovane u 2 ml *PBS* i analizirane protočnom citofluorimetrijom.

3.5.4.4. Merenje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i azot monoksida (NO)

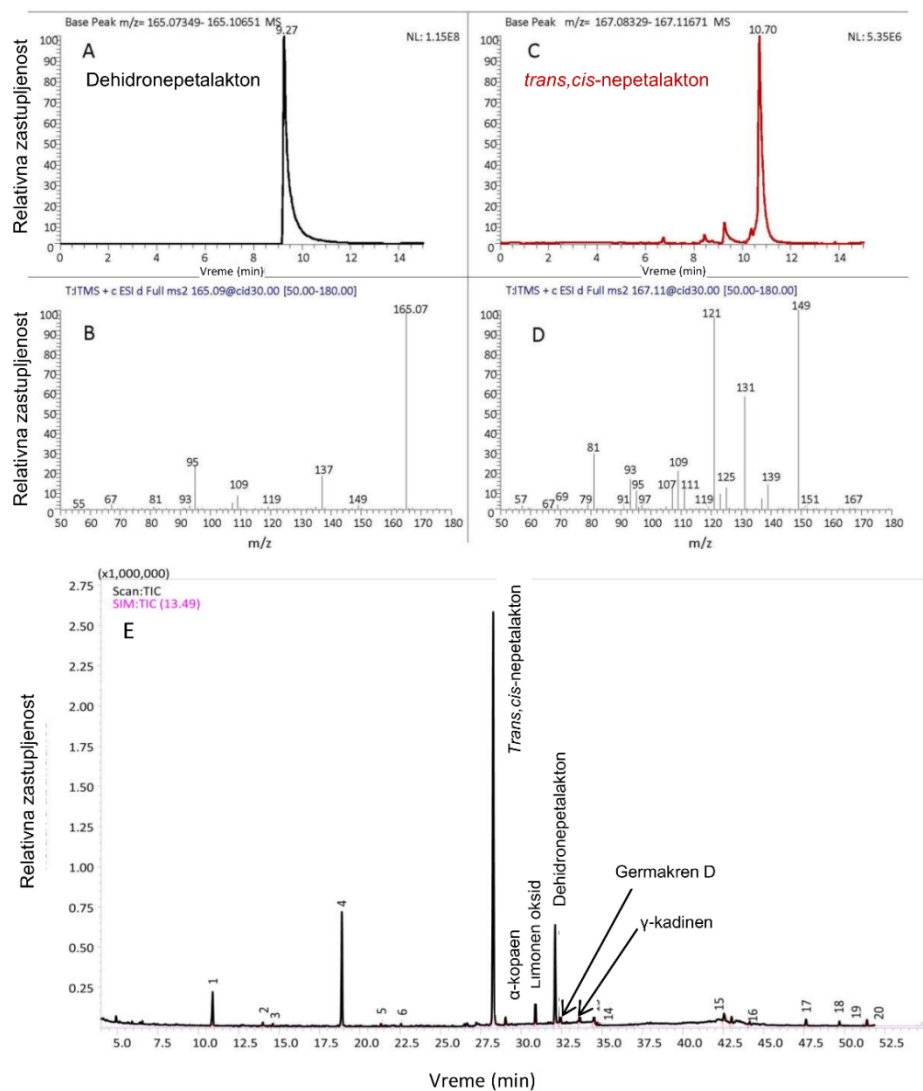
Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, *ROS*) u makrofagima je određena metodom protočne citofluorimetrije. Makrofagi su pretretirani različitim koncentracijama metanolnih ekstrakata listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* (250 µg/ml), kao i *trans,cis*-NL i *cis,trans*-NL (50 µg/ml) u trajanju od 24h. Zatim je ćelijama dodato 500 µl 1 µM dihidrorodamina (*DHR*, *Sigma-Aldrich*, Nemačka) u 10% *RPMI* i usledila je inkubacija 30 min na 37 °C. Nakon toga su supernatanti odliveni, a ćelijama je dodat rastvor *LPS* (100 ng/ml) u cilju stimulacije produkcije *ROS*. Potom je usledilo inkubiranje 90 min na 37 °C. Ćelije su nakon toga isprane 2×1 ml *PBS*, skinute sa podloge, centrifugirane 3 min pri brzini od 500g, finalno resuspendovane u 2 ml *PBS* i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Produkcija azot monoksida (NO) u makrofagima je određena Grisovom reakcijom, koja se zasniva na merenju koncentracije nitrita kao indikatora proizvodnje NO. Kako bi se simulirala produkcija NO makrofagi su tretirani sa *LPS*. Po 50 µl supernatanta iz svakog bunara pomešano je sa 50 µl Grisovog reagensa (1:1 (v:v) rastvor 1% sulfanilamida i 0,1% naftiletildiamin dihidrohlorida u 5% H_3PO_4). Zatim je merena apsorbanacija tako nastalog rastvora u mikrotitar ploči na spektrofotometru (*Titertek*, Nemačka) na 540 nm, a koncentracija nitrita izračunata je na osnovu kalibracione prave dobijene određivanjem apsorbanacija poznatih koncentracija $NaNO_2$.

4. Rezultati

4.1 Određivanje mesta biosinteze i akumulacije nepetalaktona u listovima *N. rtanjensis* na nivou tkiva

4.1.1. Identifikacija nepetalaktona u metanolnom ekstraktu listova *N. rtanjensis*

Identifikacija iridoidnih jedinjenja izvršena je pomoću *UHPLC–LTQ/Orbitrap/MS* analize sa visokom rezolucijom, u pozitivnom jonizacionom modu (**Slika 20**). Prisustvo dehidronepetalaktona (DNL) (**Slika 20 A**) i *trans,cis*-nepetalaktona (NL) (**Slika 20 C**) utvrđeno je detekcijom masa pseudomolekularnih jona $[M+H]^+$ karakterističnih za NL i DNL, i poređenjem njihovih MS^2 obrazaca fragmentacije sa fragmentacionim profilima standarda.



Slika 20. Profilsanje nepetalaktona u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis*: *UHPLC-Orbitrap MS* jonski hromatogrami sa retencionim vremenima, tačnim masama i masenim spektrima DNL (A i B) i *trans,cis*-NL (C i D). *GC-MS* hromatogram ukupnih jona (E) dobijen u pozitivnoj hemijskoj jonizaciji komponenti metanolnog ekstrakta *N. rtanjensis*, na kome su obeleženi pikovi koji odgovaraju sledećim jedinjenjima: *trans,cis*-NL, α -kopaen, limonen oksid, DNL, germakren D i γ -kadinen.

Na hromatogramu ukupnih jona (eng. *Total Ion Chromatogram, TIC*) uočljiv je pik DNL (**Slika 20 B**), sa pseudomolekularnim jonom $[M+H]^+$ mase od 165,08936 m/z na retencionom vremenu (R_t) od 9,25 min, kao i *trans,cis*-NL sa $[M+H]^+$ masom od 167,10499 m/z na $R_t = 10,70$ min (**Slika 20 D**). Uočava se sličan trend fragmentacije kod NL i DNL, koji karakterišu gubici C_2H_4 (-28 amu) i C_4H_8 (-56 amu).

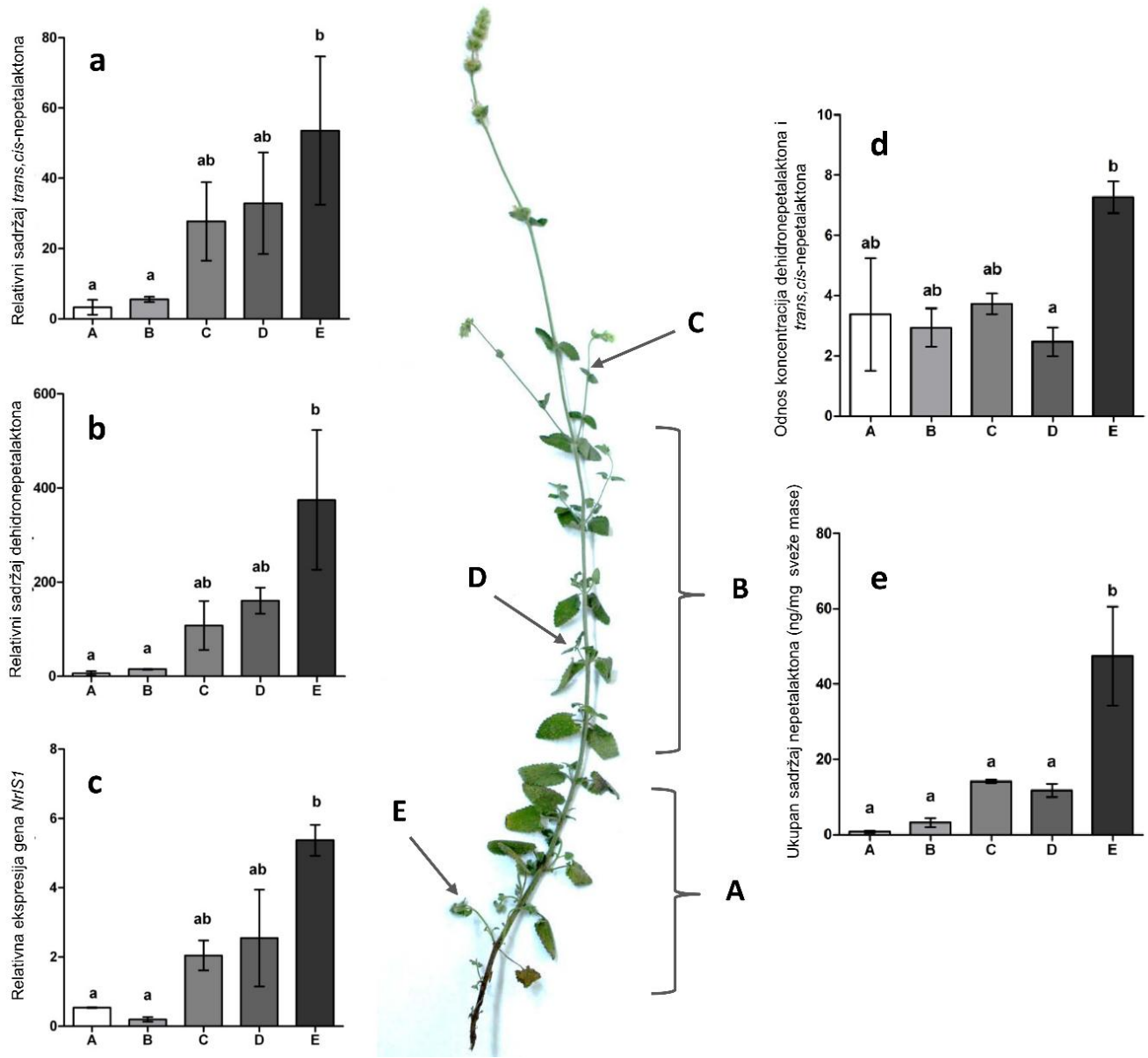
GC-MS kvalitativna analiza potvrdila je prisustvo *trans,cis*-NL i DNL u sadržaju metanolnog ekstrakta listova *N. rtanjensis*. *Trans,cis*-NL ($R_t = 28,26$ min) izdvaja se kao dominantan pik na *GC-MS* hromatogramu ukupnih jona (*TIC*), dok je DNL ($R_t = 32,09$ min) treći pik po veličini. Pored nepetalaktona, identifikovana su i jedinjenja koja pripadaju seskviterpenima i monoterpenima (α -kopaen, limonen oksid, germakren D i γ -kardinen).

4.1.2. Uporedna analiza nivoa ekspresije IS i sadržaja NL i DNL u različitim fazama razvića listova *N. rtanjensis*

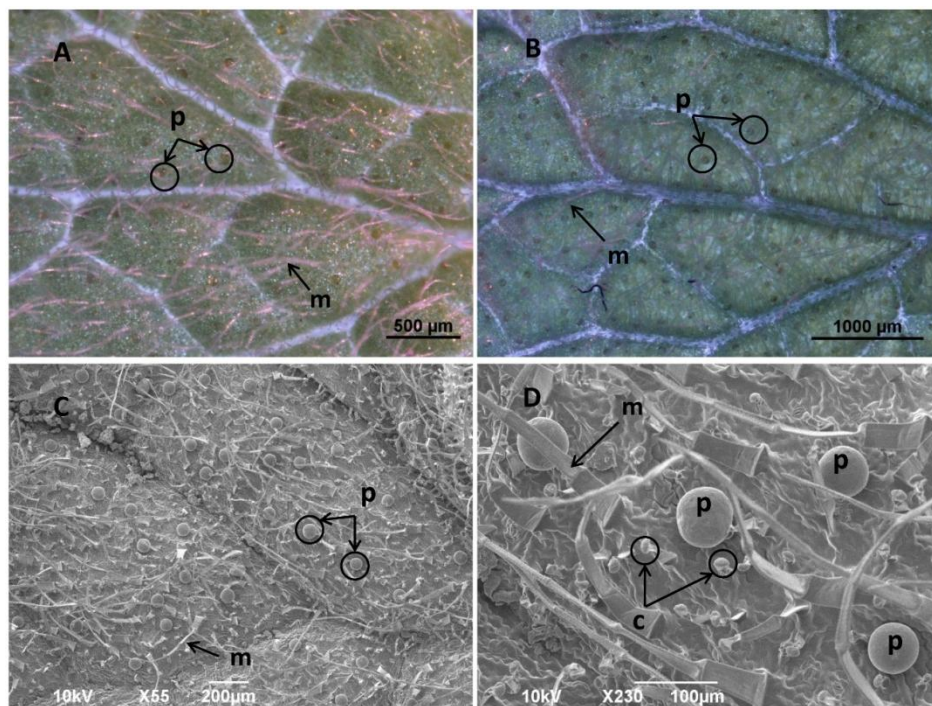
Rezultati *UHPLC/DAD/(+)HESI-MS²* kvantifikacije pokazuju da se koncentracije *trans,cis*-NL i DNL smanjuju tokom procesa razvića listova, pri čemu je sadržaj nepetalaktona najniži u najstarijim listovima (faza A), dok je zastupljenost ovih jedinjenja najviša u najmlađim analiziranim listovima (faza E) (**Slika 21 a, 21 b**). Koncentracija *trans,cis*-NL je 22 puta, a DNL čak 80 puta niža u listovima faze A u odnosu na listove faze E. Takođe, količnik koncentracija DNL/*trans,cis*-NL je značajno veći u najmlađoj fazi u odnosu na ostale analizirane faze razvića listova *N. rtanjensis* (**Slika 21 d**). Zbirni sadržaj ova dva jedinjenja prati isti trend, pri čemu je statistički značajno veća količina nepetalaktona prisutna u fazi E (**Slika 23 e**). Uporedo sa koncentracijama dominantnih specijalizovanih metabolita, praćena je ekspresija gena *NrIS1*, za koji su konstruisani specifični prajmeri za *PCR* u realnom vremenu (**Slika 21 c**). Relativna ekspresija *NrIS1* pokazuje isti obrazac u pet različitim fazama razvića listova, tako da je u mlađim razvojnim fazama (C, D i E) viša u odnosu na starije faze (A i B) potpuno razvijenih listova. Ekspresija *NrIS1* dostiže najvišu vrednost u fazi E, pri čemu je ona približno 7 puta veća nego u fazi A i 5 puta veća nego u listovima faze B.

4.1.3. Analiza sadržaja trihoma i listova *N. rtanjensis* nakon abrazije suvim ledom pomoću *UHPLC/(+)HESI-MS/MS* i Ramanove spektroskopije

Na mikrografijama svetlosnog mikroskopa (**Slika 22 A i 22 B**) i na *SEM* mikrografijama (**Slika 22 C i 22 D, 23 A**) se uočava da je površina listova *N. rtanjensis* gusto prekrivena višecelijskim mehaničkim trihomima, kao i glandularnim trihomima peltatnog i kapitatnog tipa. Mehanički trihomi formiraju gustu mrežu kojom prekrivaju celu površinu lista, naročito na naličju. Sekretorne glave glandularnih trihoma peltatnog tipa sastoje se od četiri ćelije, dok su glave trihoma kapitatnog tipa jednoćelijske ili dvoćelijske. Izolat trihoma, sakupljen nakon abrazije listova suvim ledom, prikazan je na mikrografiji svetlosnog mikroskopa (**Slika 23 B**), na kojoj se uočavaju mehanički trihomi, kao i oba tipa glandularnih trihoma. Uspešnost primenjene tehnike abrazije glandularnih trihoma suvim ledom vidljiva je na **Slici 23 C**, na kojoj se može uočiti da su kapitatni trihomi potpuno odstranjeni sa površine listova, kao i veći deo peltatnih. Peltatni trihomi se u manjem broju zadržavaju na površini lista nakon abrazije suvim ledom i dodatnog odstranjivanja sintetičkom četkicom. *UHPLC/(+)HESI-MS/MS* analiza ukazala je na niži sadržaj nepetalaktona u listovima nakon abrazije, nego u izolovanim glandularnim trihomima (**Slika 23 D**). Detektovano je približno 1,2 puta više *trans,cis*-NL i 2 puta više DNL u izolatu trihoma u odnosu na listove nakon abrazije.



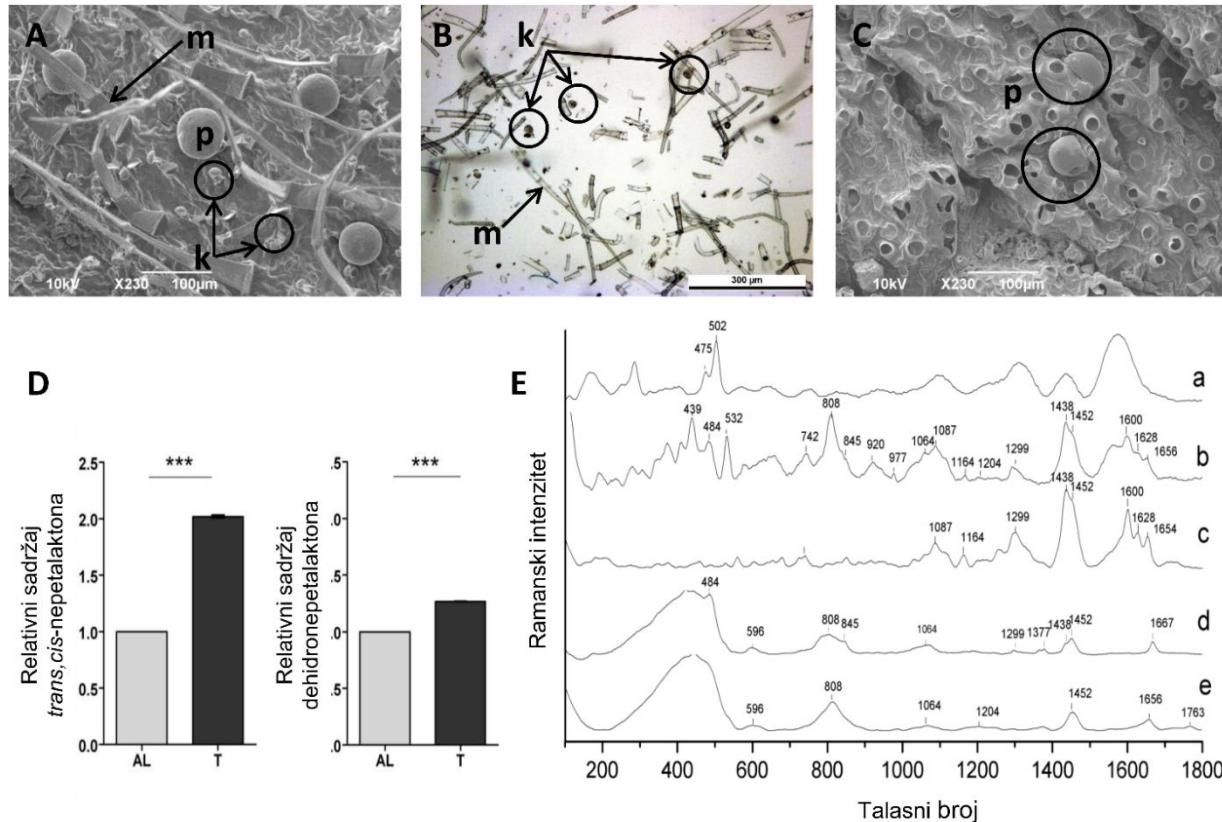
Slika 21. Analiza sadržaja nepetalaktona i ekspresije *NrIS1* u pet različitim razvojnim stadijuma razvića listova *N. rtanjensis* (A–E). Listovi su sakupljeni sa biljaka u fazi cvetanja i obeleženi su na sledeći način: prvih (A) i drugih (B) pet pari potpuno razvijenih listova glavnog stabla (gledano od osnove ka vrhu), listovi lateralnih grana sa razvijenim cvastima (C), listovi mladih pazušnih izdanaka u fazi formiranja jednog para listova (D), najmlađi listovi koji se formiraju na zeljastim bočnim izdancima u osnovi glavnog stabla (E). Na slici je prikazan sadržaj *trans,cis*-NL (a) i DNL (b) u pet različitim stadijuma razvića listova normalizovan u odnosu na sadržaj ovih jedinjenja u stablu. Nivoi ekspresije gena *NrIS1* u pet razvojnih stadijuma listova *N. rtanjensis* normalizovani su u odnosu na *18S rRNK* i predstavljeni relativno u odnosu na stablo kao kalibrator (c). Na slici su predstavljeni i odnosi koncentracija DNL/*trans,cis*-NL (d) i zbir koncentracija *trans,cis*-NL i DNL (e) u pet različitim stadijuma razvića listova *N. rtanjensis*. Rezultati su prikazani u vidu srednjih vrednosti tri biološka ponavljanja ± srednja greška. Na svim histogramima vrednosti obeležene različitim slovima se značajno razlikuju ($p \leq 0,01$) prema *post hoc* Tukey testu *One-way ANOVA*.



Slika 22. Prikaz površine listova *N. rtanjensis*. Mikrografije sa svetlosnog mikroskopa adaksijalne (A) i abaksijalne (B) površine lista, na kojima se uočavaju peltatni glandularni (p) i mehanički (m) trihomi. SEM mikrografije adaksijalne (C i D) površine lista na različitim uveličanjima prikazuju peltatne (p) i kapitatne (c) trihome, kao i mehaničke (m) trihome. Bar A = 500 μm, B = 1000 μm, C = 200 μm, D = 100 μm.

Kako bi bilo utvrđeno koji tip trihoma je mesto akumulacije nepetalaktona korišćena je Ramanova spektroskopija. Analizom spektralnih regiona na $100\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ upoređen je sastav kapitatnih (**Slika 23 Ea**), peltatnih glandularnih trihoma (**Slika 23 Eb**) kao i mehaničkih trihoma (**Slika 23 Ec**) sa standardom *cis,trans*-nepetalaktola (**Slika 23 Ed**) i etarskog ulja *N. rtanjensis* (**Slika 23 Ee**). Nepetalaktol je prekursor nepetalaktona i strukture ova dva jedinjenja su veoma slične, te je očekivano da neće biti detektovane velike razlike u njihovim Raman spektrima. Zbog visokog udela nepetalaktona (oko 88%) u etarskom ulju *N. rtanjensis* (Dmitrović i sar., 2015). Raman spektar prikazuje profil za koji se, u poređenju sa spektrom *cis,trans*-nepetalaktola, može pretpostaviti da je karakterističan za nepetalakton (**Slika 23 Ed i 23 Ee**). Manji pik na 1763 cm^{-1} u uzorku etarskog ulja predstavlja C=O vezu laktonskog petočlanog prstena (Yohannan Panicker i sar., 2006). Na Raman spektrima nepetalaktola i etarskog ulja izdvajaju se pikovi u opsegu između $1600\text{ i }1700\text{ cm}^{-1}$, koji se mogu pripisati istežućim vibracijama veza C=C i C=O iridoida (Schulz i Baranska, 2007). U etarskom ulju uočava se pik na 1656 cm^{-1} , koji se u nepetalaktolu nalazi na 1667 cm^{-1} . Opseg frekvencija nižih od 1500 cm^{-1} predstavlja pikove poreklom od jednostrukih veza i različitih savijajućih vibracija, te je nazvan „otisak prsta” (Camp i sar., 2014). Različiti pikovi opsega $1200\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ su vezani za CH₂ modove i CH deformacione vibracije (Yohannan Panicker i sar., 2006). Takođe, pikovi oko $1377, 1064\text{ i }808\text{ cm}^{-1}$ karakteristični su za NL i nepetalaktol. Manji pik na 1064 cm^{-1} poreklom je najverovatnije od C-O-C istežućih vibracija (Yohannan Panicker i sar., 2006). Poređenjem Raman spektara etarskog ulja sa spektrima glandularnih trihoma uočava se znatna sličnost, naročito sa peltatnim glandularnim trihomima. Etarskom ulju, nepetalaktolu i peltatnim trihomima zajednički je pik na 808 cm^{-1} . Ovaj pik se smatra najznačajnijim signalom koji definiše supstitucije aromatičnih prstenova (Lin-Vien i sar., 1991). Pik na 742 cm^{-1} , vidljiv

na Raman spektru peltatnih glandularnih trihoma, poreklom je od deformacionih vibracija prstena, koji se često nalaze kod cikličnih terpena (Schulz i Baranska, 2007). Raman spektar kapitatnih glandularnih trihoma iznad 1100 cm^{-1} maskiran je snažnom fluorescencijom. Vidljivi deo spektra ispod 1460 cm^{-1} karakterističan je za C-O-C istežuće vibracije molekula celuloze i hemiceluloze (Agarwal, 1999; Gierlinger i Schwanninger, 2007; Szymańska-Chargot i sar., 2016), koji je zastupljen i u spektru mehaničkih trihoma. Pikovi na 1600 , 1628 i 1654 cm^{-1} spektara mehaničkih trihoma najverovatnije odgovaraju ligninu ćelijskog zida (Agarwal, 1999), a nalaze se i u peltatnim trihomima.

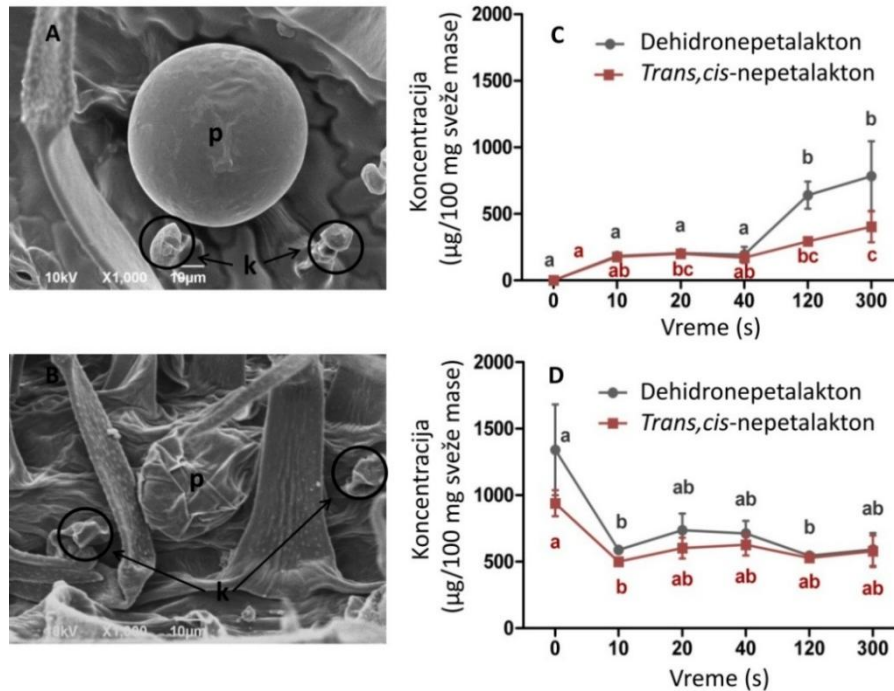


Slika 23. SEM mikrografije prikazuju mehaničke (m), kapitatne (c) i peltatne (p) glandularne trihome na površini intaktnog (A) lista, kao i peltatne (p) glandularne trihome, koji su se zadržali na površini lista *N. rtanjensis* nakon abrazije suvim ledom (C), bar = $100\text{ }\mu\text{m}$. Na mikrografiji svetlosnog mikroskopa izolata trihoma (B) pokazane su individualni kapitatni (c) i mehanički (m) trihomi, bar = $300\text{ }\mu\text{m}$. Sadržaj *trans,cis*-NL i DNL u izolovanim trihomima (T) i listovima nakon abrazije (AL) prikazan je relativno u odnosu na AL (D). Rezultati su prikazani u vidu srednjih vrednosti za tri biološka ponavljanja \pm standardna greška. Zvezdice označavaju statističku značajnost na osnovu *paired* t-test analize (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,001$, *** $P \leq 0,0001$). Raman spektar (H) spektralnog regiona od 100 do 2000 cm^{-1} : a) kapitatnog b) peltatnog glandularnog trihoma i c) mehaničkog trihoma lista *N. rtanjensis*, d) standard nepetalaktola i e) etarsko ulje *N. rtanjensis* (sadrži 88% nepetalaktona).

4.1.4. Analiza sadržaja nepetalaktona u glandularnim trihomima *N. rtanjensis*

Korišćena metoda efikasna je u ekstrakciji sadržaja glandularnih trihoma, pri čemu ne dolazi do mehaničkog oštećivanja ili ekstrakcije sadržaja iz drugih tkiva listova. Sveže sakupljeni listovi *N. rtanjensis* uranjani su u DCM tokom 10, 20, 40, 120 ili 360 s, a zatim je proverena efikasnost ekstrakcije paralelnom UHPLC/(+)HESI-MS/MS kvantifikacijom nepetalaktona u listovima i u ekstraktima nakon uranjanja u DCM. Površina listova pre uranjanja u DCM prikazana je na mikrografiji (Slika 24 A), na kojoj je uočljivo prisustvo svih tipova mehaničkih i glandularnih trihoma karakterističnih za *N. rtanjensis*. Na mikrografiji lista nakon uranjanja u DCM u trajanju od 40 s (Slika 24 B) uočava se da je

proces ekstrakcije doveo do urušavanja subkutikularnog prostora kako peltatnih, tako i kapitatnih glandularnih trihoma, dok oštećenja zida epidermisa nisu vidljiva. Takođe, na manjem uveličanju površine lista (mikrografija nije prikazana) uočava se da je došlo do morfoloških promena na većini glandularnih trihoma. Koncentracija *trans,cis*-NL i DNL u ekstraktima *DCM* rasla je uporedo sa dužinom trajanja tretmana (Slika 24 C). Istovremeno, koncentracija ova dva jedinjenja smanjivala se u listovima nakon uranjanja u *DCM*. (Slika 24 D). Uočeno je da je već uranjanje listova u *DCM* u trajanju od 10 s značajno smanjilo sadržaj *trans,cis*-NL i DNL u listovima.

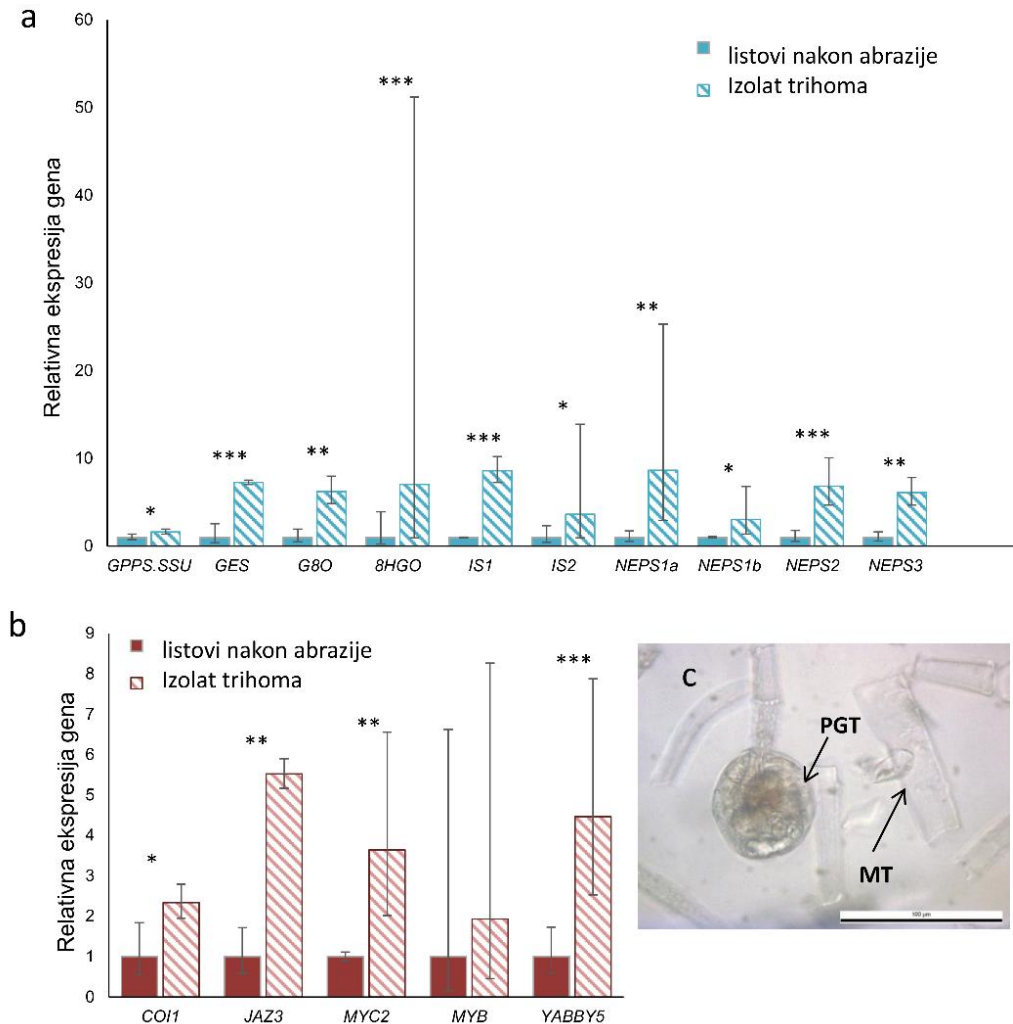


Slika 24. SEM mikrografije intaktne adaksijalne površine lista *N. rtanjensis* neposredno pre (A) i posle uranjanja u *DCM* u trajanju od 40 s (B) na kojima se vidi efekat organskog rastvarača na morfologiju peltatnih (p) i kapitatnih (c) glandularnih trihoma, bar = 10 µm. UHPLC/DAD/ + HESI-MS/MS analiza koncentracije DNL (obebežen sivom bojom) i *trans,cis*-NL (obebežen crvenom bojom) u reziduama organskog rastvarača *DCM* nakon uranjanja listova i (D) listova nakon uranjanja u *DCM* u trajanju od 0, 10, 20, 40, 120 i 360 s. Rezultati su predstavljeni u vidu srednjih vrednosti ± standardna greška (SE) tri biološka ponavljanja, Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju ($p \leq 0,01$) prema *One-way ANOVA* sa *post hoc Tukey* testom.

4.1.5. Biosinteza nepetalaktona se specifično odvija u izolovanim trihomima listova *Nepeta rtanjensis*

U transkriptomskoj bazi listova *N. rtanjensis* identifikovani su geni kandidati biosintetskog puta nepetalaktona (*NrGPPS*, *NrGES*, *NrG8O*, *Nr8HGO*, *NrIS1*, *NrIS2*, *NrNEPS1a*, *NrNEPS1b*, *NrNEPS2* i *NrNEPS3*), kao i gena za odabrane transkripcione faktore, za koje se pretpostavlja da učestvuju u regulaciji biosinteze nepetalaktona (*NrCOI*, *NrJAZ3*, *NrMYB*, *NrMYC2* i *NrYABBY5*). Funkcija pronađenih sekvenci je pretpostavljena na osnovu visokog procenta sličnosti (preko 70%) sa funkcionalno okarakterisanim sekvencama iz javno dostupne *NCBI* baze podataka. Visoko specifični prajmeri za *qPCR* su dizajnirani na osnovu ovih sekvenci i amplifikacija proizvoda očekivanih dužina je potvrđena na agaroznom gelu kod obe vrste, kao i sekvenciranjem amplifikovanih fragmenta. Specifičnost amplifikacije svih gena tokom *qPCR* analize potvrđena je analizom kriva topljenja, dok je efikasnost reakcija za sve gene bila u okviru preporučenih vrednosti (90–110%, nagib krive -3,1 do -3,6) (Materijal i metode, Slika 8).

Kako bi se dodatno potvrdila funkcija gena kandidata za enzime i odabrane transkripcijske faktore, koji učestvuju u biosintetskom putu nepetalaktona, analizirana je njihova ekspresija u izolatu trihoma (T) i listovima nakon abrazije suvim ledom (AL). Rezultati su pokazali značajno višu ekspresiju svih biosintetskih gena u izolatu trihoma u odnosu na listove nakon abrazije (**Slika 25 a**). Kao i kod biosintetskih gena, nivoi ekspresije većine transkripcijskih faktora značajno su viši u izolovanim dlakama (**Slika 25 b**). Naime, *NrCOI1*, *NrJAZ3*, *NrMYC2* i *NrYABBY5* se više ekspimiraju u izolatu trihoma, u odnosu na tkiva listova nakon mehaničkog odvajanja trihoma sa njihove površine (**Slika 25 b**). Razlike u nivoima transkripata *NrMYB* između trihoma i listova nakon abrazije nisu statistički značajne.



Slika 25. Relativna ekspresija pretpostavljenih gena biosintetskog puta NL u izolovanim dlakama i listovima nakon abrazije (a). Nivoi transkripata gena za odabrane transkripcijske faktore u izolatu trihoma i u listovima *N. rtanjensis* nakon abrazije suvim ledom (b). Rezultati ekspresije su normalizovani na *18S rRNA* i predstavljeni relativno u odnosu na listove nakon abrazije. Greške su predstavljene u vidu standardne devijacije tri biološka ponavljanja. Zvezdice (*) označavaju statističke značajnosti između vrednosti ekspresije gena u izolatu trihoma i u listovima nakon abrazije (*paired t-test*, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$). Svetlosna mikrofotografija izolata trihoma (c) prikazuje peltatni tip glandularnih trihoma (PGT) i mehaničke trihome (MT), bar = 100 µm. Svetlosni mikroskop (*Leica DM2000*, Nemačka) korišćen je za analizu izolata trihoma listova *N. rtanjensis*. Skraćenice: GPPS – geranil difosfat sintaza, GES – geraniol sintaza, G8O – geraniol oksidaza, 8HGO – 8-hidroksigeraniol oksidoreduktaza, IS – iridoid sintaza, NEPS – kratkolančana dehidrogenaza vezana za nepetalaktol, COI1 – *coronatine-insensitive 1*, JAZ3 – *jasmonate ZIM-domain 3*, MYC2 – transkripcijski faktor koji odgovara MYC2, MYB – transkripcijski faktor sa MYB-domenom, YABBY5 – YABBY5 transkripcijski faktor.

4.2. Promene u metabolizmu nepetalaktona u listovima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* tokom eksperimentalno indukovane dehidracije polietilen glikolom (PEG)

Vodni stres u biljkama *N. rtanjensis* i *N. argolica*, gajenim u uslovima *in vitro*, simuliran je dodavanjem osmolita polietilen glikola (PEG) u ½ MS hranljivu podlogu. Netretirana grupa biljaka gajena je na tečnoj ½ MS podlozi bez dodatka saharoze i PEG-a. Nakon jednog (1DPT), tri (3DPT) i šest dana (6DPT) od postavke eksperimenta, listovi netretiranih biljaka i biljaka na tretmanu PEG-om su sakupljeni, a zatim je u njima analiziran sadržaj nepetalaktona, kao i ekspresija pretpostavljenih gena za enzime koji učestvuju u biosintetskom putu NL i za transkripcione faktore koji regulišu ovaj biosintetski put. Za ovaj eksperiment su odabrane *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*, koje, iako blisko srodne, pokazuju različit sastav izomera nepetalaktona i njegovih derivata.

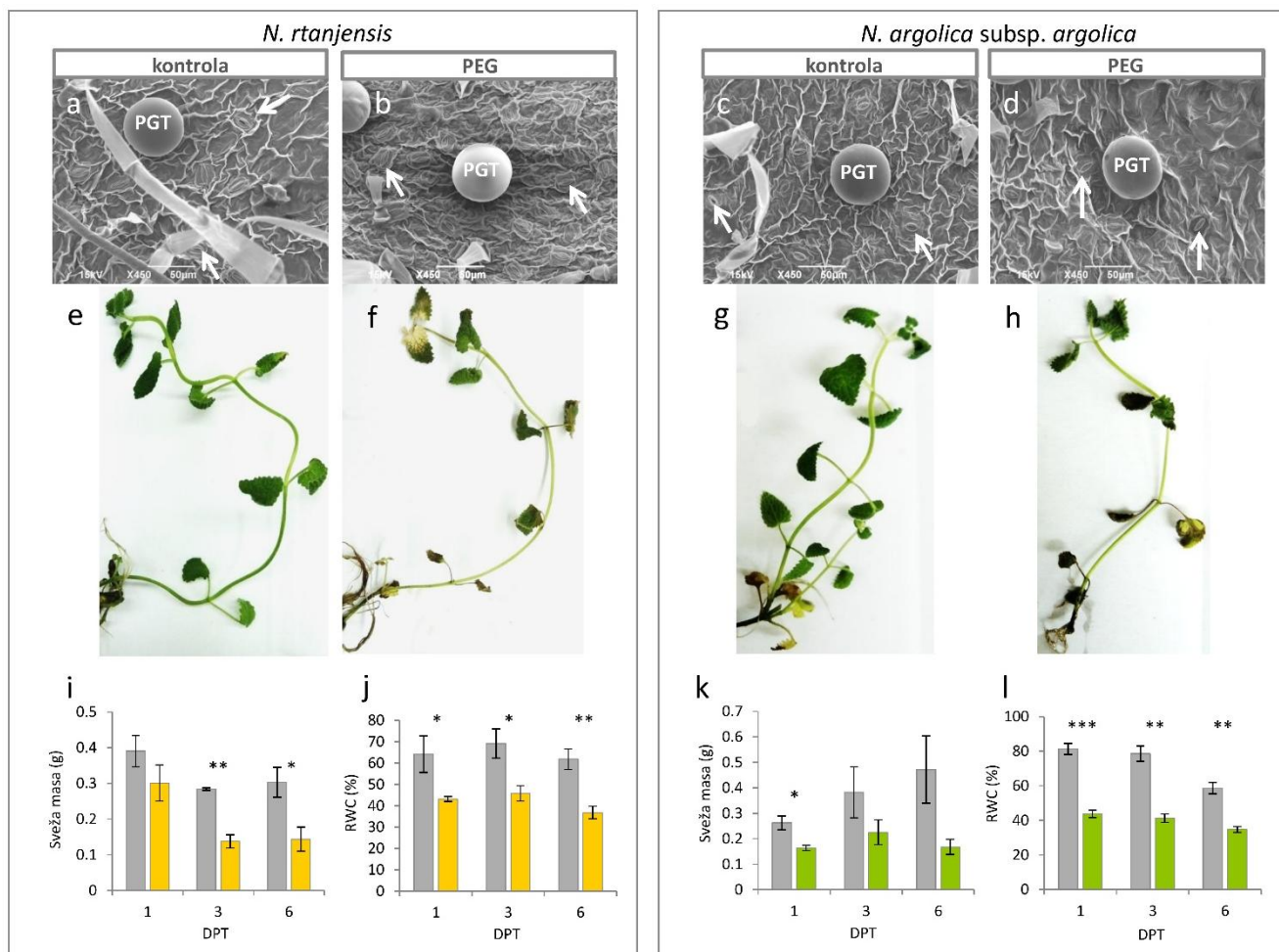
4.2.1. Uticaj polietilen glikola (PEG-a) na promene morfoloških i fizioloških parametara jedinki *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*

Mikrografije svetlosnog mikroskopa i SEM prikazuju da se glandularni trihomi peltatnog tipa vrsta *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* sastoje od četiri sekretorne ćelije, proširene kutikule i velikog subkutikularnog prostora, što je u skladu sa ranijim publikacijama. Kao odgovor na dehidraciju pod uticajem PEG-a, dolazi do zatvaranja stoma, što se uočava na SEM mikrografijama površine listova *N. rtanjensis* (Slika 26 a i 26 b) i *N. argolica* subsp. *argolica* (Slika 26 c i 26 d). S druge strane, na istim mikrografijama nisu uočljive morfološke promene glandularnih trihoma peltatnog tipa.

Gubitak turgora i smanjenje sveže mase *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* na podlozi sa PEG-om (Slika 26 a do 26 h, 26 i i 26 k) dodatno ukazuju na to da se biljke suočavaju sa vodnim stresom. Intenzitet stresa je ispitan poređenjem relativnog sadržaja vode (RWC) u kontrolnim biljkama i biljkama gajenim na podlozi sa dodatkom PEG-a (Slika 26 j i 26 l). Najviše vrednosti RWC kod *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* (u proseku 65%, odnosno 72%) izmerene su kod netretiranih biljaka i ove vrednosti se nisu značajno menjale tokom trajanja eksperimenta. Nasuprot tome, kod biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom PEG-a, RWC je snižen, pri čemu su najniže vrednosti, od 37% kod *N. rtanjensis* i 35% kod *N. argolica* subsp. *argolica*, evidentirane u biljkama 6DPT. U svim vremenskim tačkama eksperimenta (1DPT, 3DPT i 6DPT) RWC je snižen kod biljaka izloženih dehidraciji u poređenju sa kontrolnim, tj. netretiranim biljkama. Kod biljaka *N. rtanjensis* gajenih na PEG-u RWC je u proseku niži za 35%, a kod *N. argolica* subsp. *argolica* za 45% u odnosu na netretirane biljke. Vodni potencijal hranljive podoge sa dodatkom PEG-a iznosio je -3MPa i, uzevši u obzir analizirane morfološke i fiziološke parametre, predstavlja vodni stres jakog intenziteta za obe analizirane vrste.

4.2.2. Uticaj PEG-a na metabolički profil nepetalaktona u listovima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*

U metanolnim ekstraktima listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* identifikovani su NL i DNL na osnovu masa protonovanih pseudomolekularnih jona $[M+H]^+$, MS² fragmentacionih obrazaca, kao i poređenjem dobijenih rezultata sa postojećim podacima u literaturi. UHPLC/(+)HESI-MS² hromatogrami metanolnih ekstrakata *N. rtanjensis* ukazali su na prisustvo *trans,cis*-NL sa pseudomolekularnim jonom $[M+H]^+$ od m/z 167, na Rt=6,97 min (Slika 27 a), dok je pik na Rt=5,64 min, koji karakteriše $[M+H]^+$ od m/z 165, identifikovan kao DNL (Slika 27 b). Analiza metanolnih ekstrakata *N. argolica* subsp. *argolica* otkrila je *cis,trans*-NL sa očekivanim $[M+H]^+$ od m/z 167 na Rt=6,53 min (Slika 27 f), dok je DNL evidentiran na Rt=5,64 (Slika 27 g).

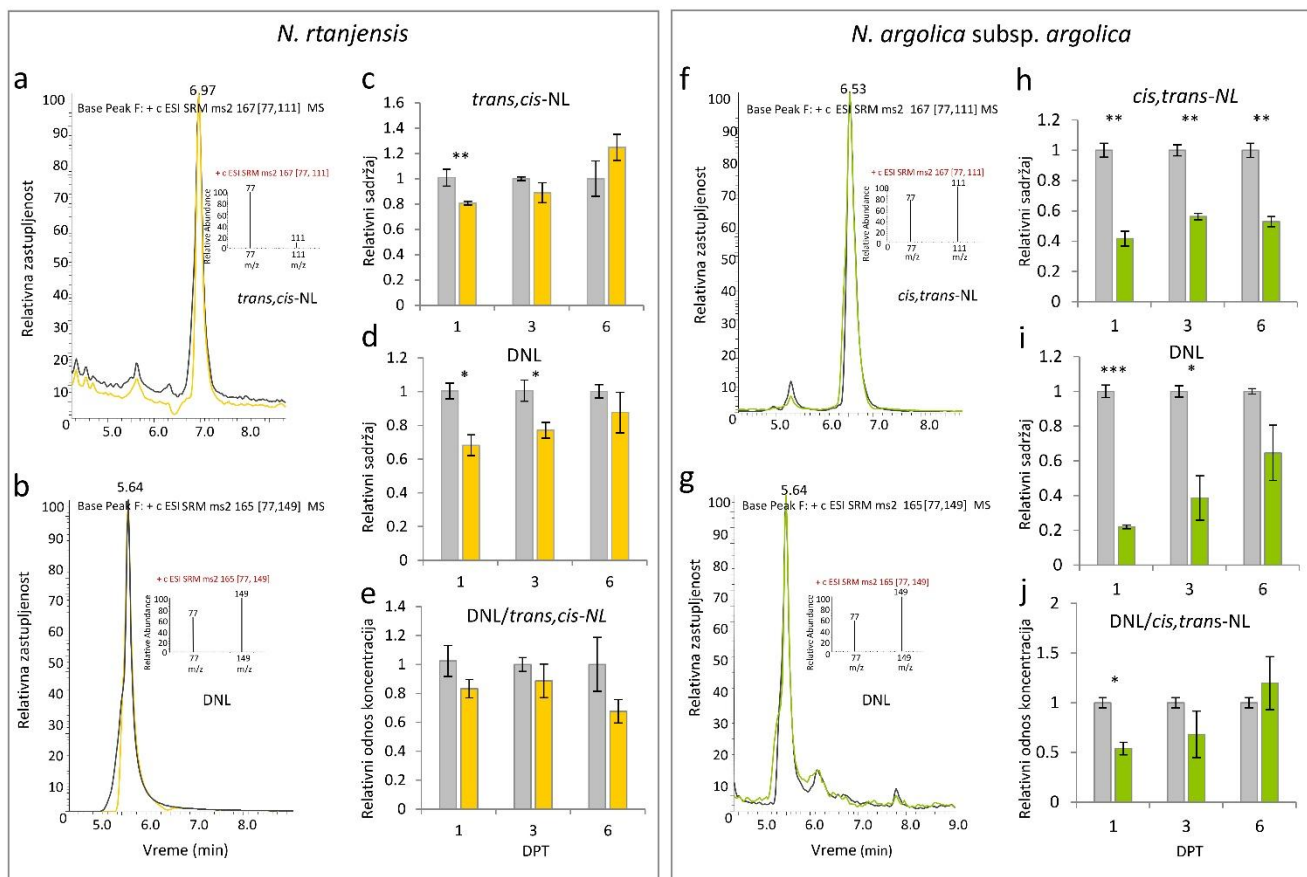


Slika 26. Izmene u morfološkim i fiziološkim parametrima *in vitro* gajenih izdanaka *N. ratanjensis* (levo) i *N. argolica* subsp. *argolica* (desno) u uslovima vodnog stresa izazvanog dodatkom PEG-a u hranljivu podlogu. Poređenjem SEM mikrografija površina listova netretiranih biljaka (a i c) i biljaka gajenih na podlozi sa PEG-om (b i d) uočava se da peltatni glandularni trihomi (PGT) zadržavaju svoju strukturu, dok se stome (označene belim strelicama) zatvaraju tokom odgovora na dehidraciju nakon 6DPT. Morfološke razlike između netretiranih biljaka (e i g) i biljaka na PEG tretmanu (f i h) nakon 6DPT ukazuju na dehidraciju tkiva i gubitak turgora kod obe vrste *Nepeta*. Kao mera intenziteta vodnog stresa, praćene su promene u svežim masama (i i k) i RWC (j i l) tokom šest dana trajanja eksperimenta. Biljke *N. ratanjensis* (žuti stubići) i *N. argolica* subsp. *argolica* (zeleni stubići) na tretmanu PEG-om upoređene su sa odgovarajućim netretiranim biljkama nakon 1DPT, 3DPT i 6DPT. Rezultati prikazuju srednje vrednosti tri biološka ponavljanja ± standardna greška. Zvezdice označavaju statističku značajnost između biljaka na tretmanu i kontrolnih biljaka (*unpaired t*-test, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$). Skraćenice: DPT – dana PEG tretmana.

Zajednički MS² fragmentacioni obrasci u pozitivnom jonizacionom modu identifikovani su na osnovu karakterističnih C₂H₄ (-28 amu) i C₄H₈ gubitaka (-56 amu) kod NL i DNL. Dominantni (+)MS² fragmenti kod *trans,cis*-NL su na *m/z* 77 (100% intenzitet), kao i na 111 *m/z* (15%) (Slika 27 a). Karakterističan glavni fragment *cis,trans*-NL uočava se na *m/z* 111 (100%), dok je manje zastupljen fragment *m/z* 77 (75%). MS² spektar DNL pokazuje sličan fragmentacioni profil kao diastereoizomeri nepetalaktona, ali dominantni (+)MS² fragmenti su na *m/z* 149 (100%) i *m/z* 77 (55%) (Slika 27 g). Identifikacija NL i DNL je dodatno potvrđena DAD analizom. Apsorpcioni spektar izomera NL je okarakterisan sa λ_{max} na 230 nm, dok u slučaju DNL vrednost λ_{max} od 300 nm ukazuje na prisustvo pirona (Ross, 1953). Nepetalaktol i 8-oksogeranial nije bilo moguće kvantifikovati u uzorcima *N. ratanjensis* i

N. argolica subsp. *argolica*, jer su njihove količine bile ispod granice detekcije (LOD) korišćene analitičke metode.

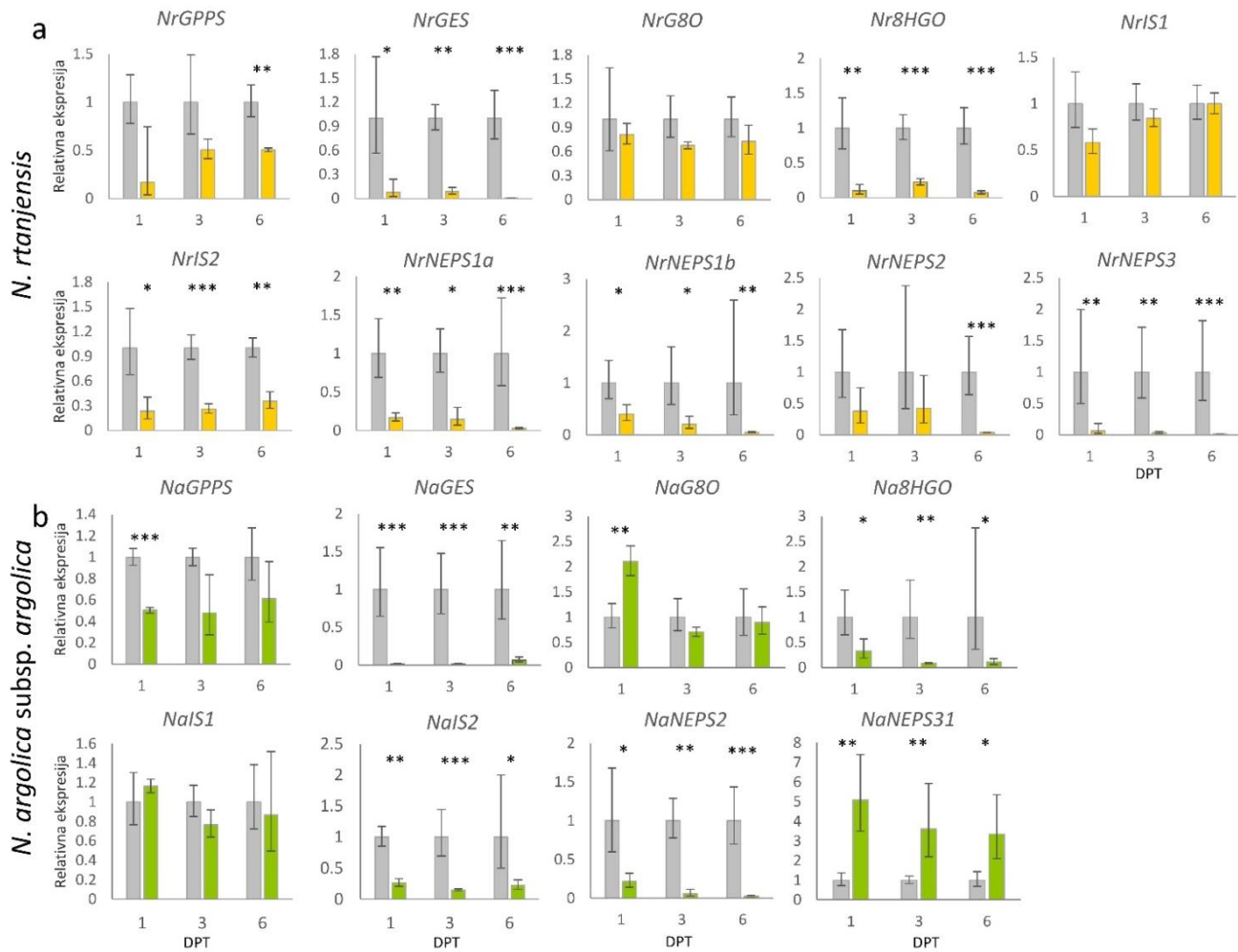
Značajno sniženje sadržaja *trans,cis*-NL i DNL (približno 1,3 puta i 1,4 puta) u listovima biljaka tretiranih PEG-om u odnosu na listove netretiranih biljaka, zapaža se već nakon 1DPT kod *N. rtanjensis* (Slike 27 c i 27 d). Niže količine *trans,cis*-NL na 3DPT i DNL na 6DPT nisu statistički značajne. Na grafiku koji prikazuje apsolutnu kvantifikaciju zapaža se da je koncentracija *trans,cis*-NL blago povišena, a DNL snižena nakon 6DPT (Prilog, Slika P1) zbog čega je odnos DNL/*trans,cis*-NL blago snižen (Slika 27 e). U poređenju sa netretiranim biljkama, sadržaj *cis,trans*-NL je približno 2 puta, a DNL 6 puta snižen kod *N. argolica* subsp. *argolica* nakon 1DPT (Slika 27 h i 27 i). Dehidracija je značajnije uticala na sadržaj DNL nego *cis,trans*-NL. Snižavanje sadržaja DNL se zaustavlja nakon 6DPT, kada razlika u količini ovog jedinjenja između netretiranih i tretiranih biljaka nije statistički značajna (Slika 27 i). Nakon početnog sniženja u količniku DNL/*cis,trans*-NL nakon 1DPT, vrednost ovog parametra raste usled porasta DNL nakon 6DPT (Slika 27 j).



Slika 27. UHPLC/(+)HESI-MS² profili nepetalaktona u netretiranim (sivi stubići) i tretiranim jednkama vrste *N. rtanjensis* (žuti stubići), kao i jednkama *N. argolica* subsp. *argolica* (zeleni stubići) nakon 1DPT, 3DPT i 6DPT. Prikazani su UHPLC-SRM (eng. *single reaction monitoring*, SRM) hromatogrami i maseni spektri koji odgovaraju *trans,cis*-NL (a) i DNL (b) detektovanim u *N. rtanjensis*, kao i *cis,trans*-NL (h) i DNL (i) iz *N. argolica* subsp. *argolica*. Sadržaj *trans,cis*-NL (c), DNL (d), kao i količnika DNL/*trans,cis*-NL u tretiranim biljkama *N. rtanjensis* normalizovani su u odnosu na sadržaje ovih jedinjenja u netretiranim biljkama nakon 1DPT, 3DPT i 6DPT. Na isti način predstavljeni su i sadržaji *cis,trans*-NL (h), DNL (j) i odnosa DNL/*cis,trans*-NL u eksperimentu sa vrstom *N. argolica* subsp. *argolica*. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri biološka ponavljanja ± standardne greške. Zvezdice (*) obeležavaju statističke značajnosti između vrednosti netretiranih i tretiranih biljaka (*unpaired* t-test, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$). Skraćenice: NL – nepetalakton, DNL – dehidronepetalakton, DPT – dana PEG tretmana.

4.2.3. Analiza ekspresije pretpostavljenih gena biosintetskog puta nepetalaktona u listovima dve vrste roda *Nepeta* tokom dehidracije

U listovima *N. rtanjensis* tokom dehidracije indukovane PEG-om analizirana je ekspresija gena kandidata *GPPS*, *GES*, *G8O*, *8HGO*, *IS1*, *IS2*, kao i četiri kandidata *NEPS* gena (*NEPS1a*, *NEPS1b*, *NEPS2* i *NEPS3*) metodom *qPCR*. U listovima *N. argolica* subsp. *argolica* izostala je amplifikacija *NEPS1a* i *NEPS1b*, pa njihova ekspresija nije analizirana.

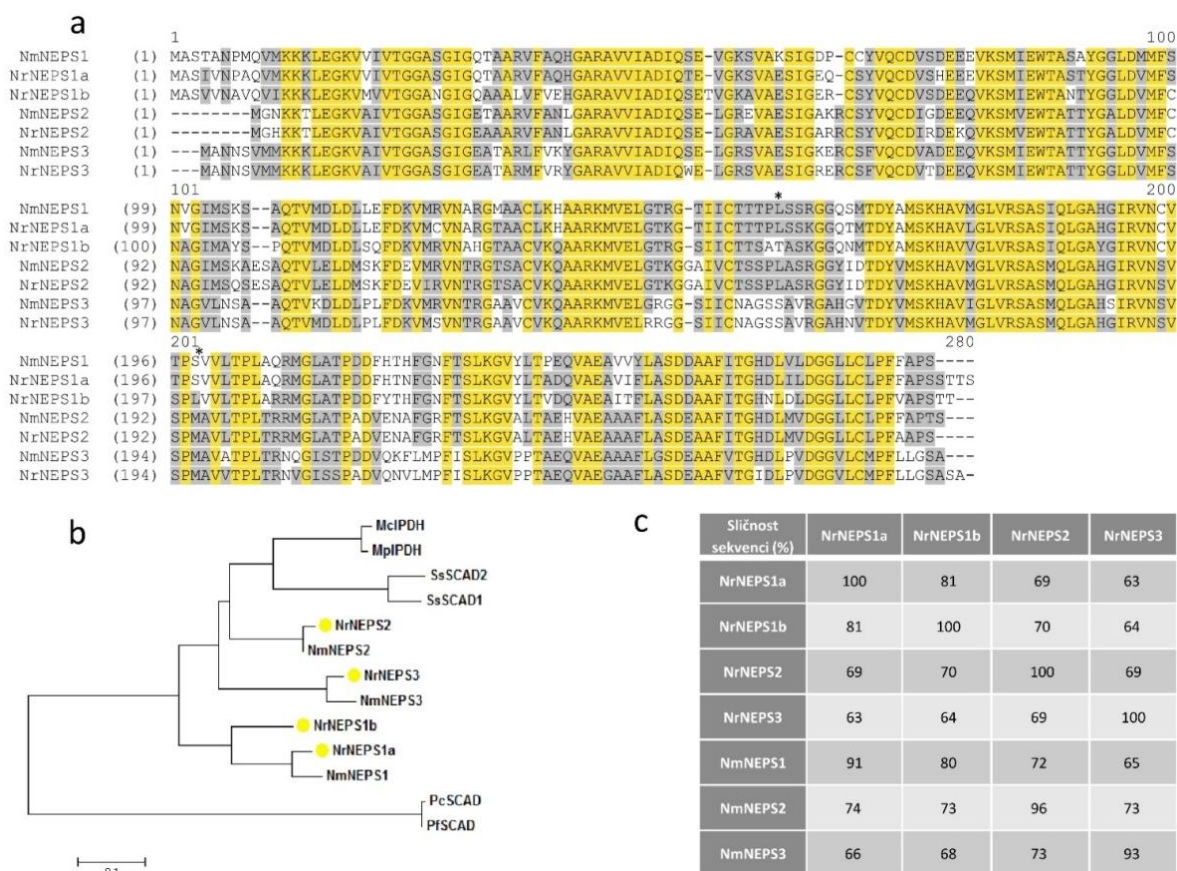


Slika 28. Relativna ekspresija pretpostavljenih gena biosintetskog puta nepetalaktona u (a) listovima *N. rtanjensis* (žuti stubići) i (b) *N. argolica* subsp. *argolica* (zeleni stubići) tokom dehidracije nakon 1DPT, 3DPT i 6DPT, izražena u odnosu na odgovarajuće kontrole. Dobijene vrednosti normalizovane su na *NrGAPDH* (a) i *NaGAPDH* (b), kao endogene kontrole, i izražene relativno u odnosu na vrednosti ekspresije gena u netretiranim biljkama (sivi stubići). Rezultati su predstavljeni u vidu srednjih vrednosti tri biološka ponavljanja \pm standardana devijacija. Zvezdice (*) označavaju statističke značajnosti između vrednosti netretiranih i tretiranih biljaka (*unpaired* t-test, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$). Skraćenice: GPPS – geranil difosfat sintaza, GES – geraniol sintaza, G8O – geraniol 8-oksidadza, 8HGO – 8-hidroksigeraniol oksidoreduktaza, IS – iridoid sintaza, NEPS – kratkolančana dehidrogenaza bliska nepetalaktolu, GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, DPT – dana PEG tretmana.

U uslovima dehidracije izazvane PEG-om, relativna ekspresija *GPPS-SSU* je snižena u listovima obe vrste približno dva puta nakon 1DPT i ovaj pad nivoa ekspresije ostaje stabilan tokom celog eksperimenta (Slike 28 a i 28 b). Geraniol sintaza (GES) koristi GPP kao supstrat pri čemu nastaje

geraniol. U poređenju sa drugim strukturnim genima biosintetskog puta nepetalaktona, nivoi transkripata *GES* pokazuju najizraženiji trend opadanja u listovima obe vrste u uslovima dehidracije.

Ekspresija gena *NrGES* u listovima *N. rtanjensis* snižena je približno 140 puta nakon 6DPT, dok je ekspresija *NaGES* kod *N. argolica* subsp. *argolica* snižena oko 80 puta nakon 1DPT, u odnosu na odgovarajuće netretirane biljke (**Slika 28 a i 28 b**). Vrednosti relativne ekspresije *NrG80* kod *N. rtanjensis* ne menjaju se značajno u odgovoru na dehidraciju izazvanu PEG-om, dok se kod *N. argolica* subsp. *argolica* blago povišena vrednost ekspresije *NaG80* uočava nakon 1DPT. Za razliku od *G80*, *8HGO* pokazuje sličan obrazac ekspresije kao i drugi ispitivani geni kod obe vrste roda *Nepeta*. Vodni deficit snižava ekspresiju *Nr8HGO* kod *N. rtanjensis* oko četiri puta (**Slika 28 a**), a *Na8HGO* kod *N. argolica* subsp. *argolica* približno tri puta (**Slika 28 a**). Iako je kod *N. rtanjensis* zabeleženo snižavanje ekspresije *NrIS1* nakon 1DPT, dehidracija nema značajnog uticaja na transkripcione nivoe *NaIS1* u listovima *N. argolica* subsp. *argolica*. S druge strane, ekspresija druge izoforme iridoid sintaze kod ove dve vrste – *NrIS2* i *NaIS2*, prati obrazac većine drugih gena biosintetskog puta NL (**Slika 28 a i 28 b**).



Slika 29. Filogenetska analiza sekvenci NrNEPS. Višestruko poravnanje peptidnih sekvenci NrNEPS1a, NrNEPS1b, NrNEPS2, NaNEPS2, NrNEPS3 i NaNEPS3 sa NmNEPS1, NmNEPS2 i NmNEPS3 (a). Zvezdice obeležavaju razlike u značajnim aminokiselinskim ostacima između NmNEPS1/NrNEPS1a i NrNEPS1b. Filogenetsko stablo je sačinjeno od peptidnih sekvenci kratkolančanih dehidrogenaza iz porodice Lamiaceae (b). Višestruko poravnanje sekvenci je napravljeno pomoću programa *Muscle* iz paketa *MEGA* verzija 6.0, a zatim je korišćena metoda najveće verovatnoće (eng. *maximum likelihood*) za formiranje filogenetskog stabla. Veličina bara predstavlja 0,1 supstituciju po mestu. NEPS sekvence pronađene u transkriptomu *N. rtanjensis* označene su žutim simbolima. Opisi skraćenica naziva proteinskih sekvenci i njihovi identifikacioni brojevi u *NCBI* bazi prikazani su u tabeli (Prilog, **Tabela P1**). Sličnost između NrNEPS i NmNEPS sekvenci (%) prikazana je tabelarno (c). Skraćenice: Nr – *N. rtanjensis*, Nm – *N. mussinii*, NEPS – kratkolančane dehidrogenaze vezane za nepetalaktol.

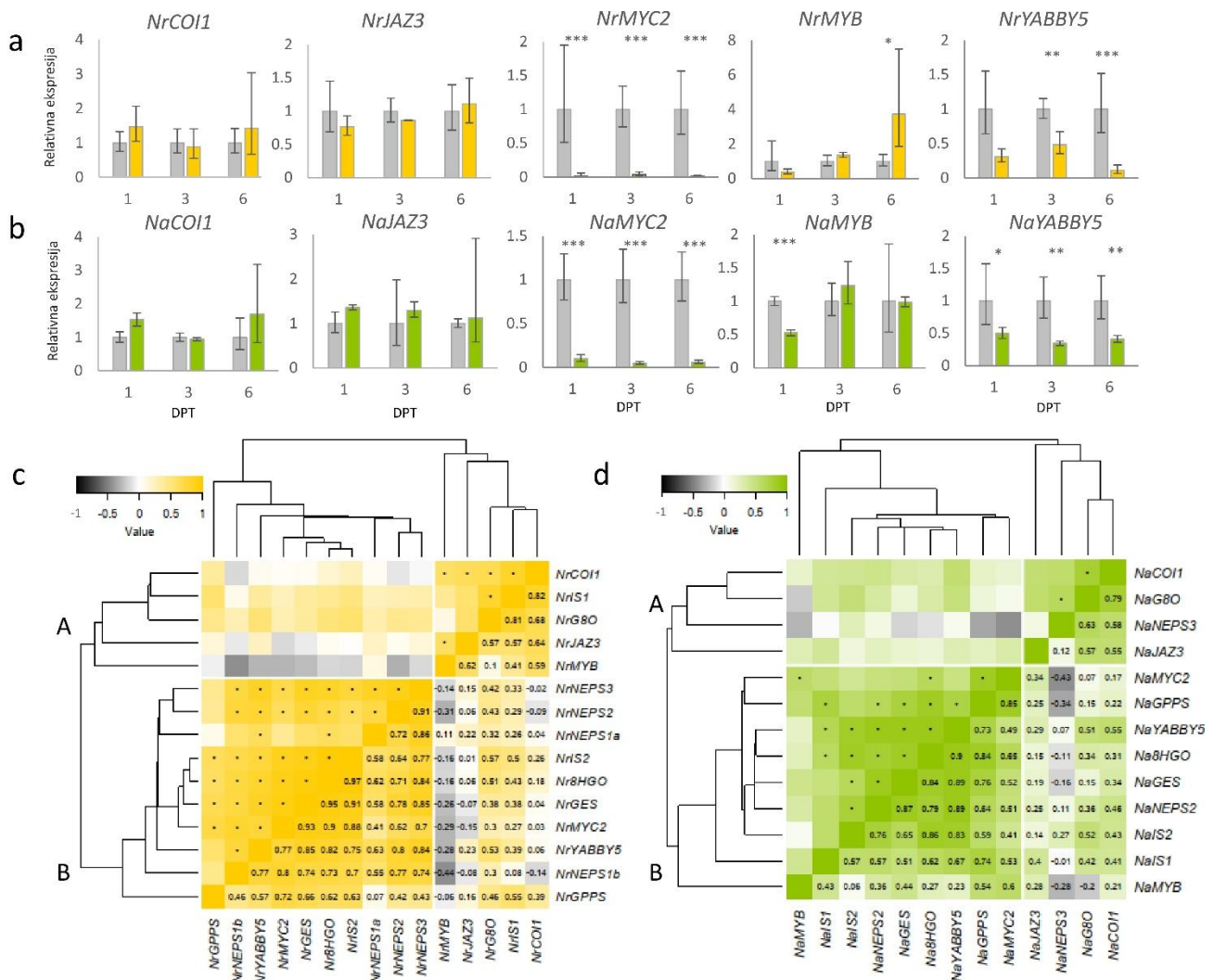
U transkriptomu *N. rtanjensis* otkrivena su četiri gena kandidata koji kodiraju za enzime NEPS, za koje je nedavno potvrđeno da katalizuju ciklizaciju 8-oksocitronelil enola/enolata do *cis,trans*- (NEPS1 i NEPS2) ili *cis,cis*-nepetalaktola (NEPS3) kod *N. mussinii* (Lichman i sar., 2019). Aminokiselinski ostaci značajni za funkciju enzima NmNEPS1 i NmNEPS3 zapažaju se (**Slika 29 a**) i u NrNEPS1a i NrNEPS3. S druge strane, pozicije L156 i S198 u sekvenci NmNEPS1 su zamenjene ostacima T157 i L198 kod NrNEPS1b (**Slika 29 a**).

Filogenetska analiza pokazuje da svi kandidati NrNEPS imaju visok stepen sličnosti sa NEPS homolozima iz *N. mussinii* i sa *trans*-izopiperitenol dehidrogenazom (ISPD) iz *M. piperita* (**Slika 29 b** i **29 c**). Poznato je da ostaci Ser153 i Pro190 određuju aktivnost NEPS3, dok su ove pozicije kod NEPS1 i NEPS2 supstituisane. Ovi ostaci su prisutni kod NrNEPS3, dok se ne nalaze kod NrNEPS1 i NrNEPS2, čime se dodatno potvrđuje identitet NrNEPS sekvenci, i može se pretpostaviti funkcija ovog enzima (**Slika 29 a**). Ekspresija svih gena kandidata za NEPS enzime kod *N. rtanjensis* (*NrNEPS1a*, *NrNEPS1b*, *NrNEPS2* i *NrNEPS3*) značajno se snižava u odgovoru na vodni stres u svim vremenskim tačkama eksperimenta (1DPT, 3DPT i 6DPT) (**Slika 28 a**). Sličan obrazac ekspresije pokazuje i *NaNEPS2*, dok su nivoi transkripata *NaNEPS3* povišeni u listovima *N. argolica* subsp. *argolica* tokom dehidratacije (**Slika 28 b**).

4.2.4. Transkripciona regulacija metabolizma nepetalaktona u trihomima listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* tokom dehidratacije

Gen koji kodira za prvi enzim JA-signalnog puta – *COII*, pokazuje stabilnu relativnu ekspresiju u listovima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* tokom trajanja PEG tretmana (**Slika 30 a**). Takođe, kod obe vrste su stabilni i nivoi transkripata gena koji kodiraju za *JAZ3* (*NrJAZ3* i *NaJAZ3*). Dehidratacija značajno snižava relativne nivoe ekspresije *MYC2* tokom trajanja eksperimenta kod obe vrste *Nepeta*, tako da *NrMYC2* i *NaMYC2* prate obrasce ekspresije većine gena biosintetskog puta NL (**Slika 30 a** i **30 b**). Izuzev porasta *NrMYB* nakon 6DPT i smanjenja *NaMYB* nakon 1DPT, nivoi ekspresije gena, koji kodiraju za MYB kod obe vrste *Nepeta*, ne pokazuju značajne promene pod uticajem vodnog deficita. U svim vremenskim tačkama eksperimenta nivoi transkripata *NrYABBY5* i *NaYABBY5* opadaju pod uticajem vodnog stresa, tako da ekspresija i ovog TF prati obrasce ekspresije biosintetskih gena (**Slika 30 a** i **30 b**).

Hijerarhijska klaster analiza (eng. *hierarchical cluster analysis*, *HCA*) ukazuje na asocijacije između nivoa ekspresije gena biosintetskog puta NL, kao i TF koji regulišu metabolizam NL tokom dehidratacije. Prikazani dendrogram (**Slika 30 c**) ukazuje na razdvajanje dve grupe gena kod *N. rtanjensis*. Klaster A čine transkripcioni faktori *NrCOII*, *NrJAZ3* i *NrMYB*, kao i biosintetski geni *NrIS1* i *NrG8O*. Ostali geni biosintetskog puta NL obrazuju klaster B zajedno sa transkripcionim faktorima *NrMYC2* i *NrYABBY5*. Na dendrogramu, koji projektuje korelacije gena iz *N. argolica* subsp. *argolica*, takođe se uočava razdvajanje dve grupe gena. Klaster A obrazuju transkripcioni faktori *NaJAZ3* i *NaCOII*, kao i *NaG8O* i *NaNEPS3*. Klaster B sačinjavaju *NaMYB*, *NaMYC2*, *NaYABBY5* i ostatak analiziranih biosintetskih gena (**Slika 30 d**). Oba dendrograma prikazuju da je većina biosintetskih gena pozitivno korelisana na osnovu profila ekspresije tokom dehidratacije, što ukazuje na njihovu koordinisanu regulaciju. Statistički značajna pozitivna korelacija prikazana je između većine gena biosintetskog puta NL, kao i između ovih gena i transkripcionih faktora *MYC2* i *YABBY5*, kod obe vrste roda *Nepeta*. U slučaju *N. argolica* subsp. *argolica*, značajna pozitivna korelacija je evidentirana samo između *NaMYB* i *NaMYC2*, dok ekspresija *NrMYB* nije u korelaciji sa drugim genima kod *N. rtanjensis*. Ekspresija *NrCOII* vrste *N. rtanjensis* je pozitivno korelisana samo sa *NrG8O* i *NrIS1*, dok je kod *N. argolica* subsp. *argolica* *NaCOII* u značajnoj pozitivnoj korelaciji samo sa *NaG8O*.



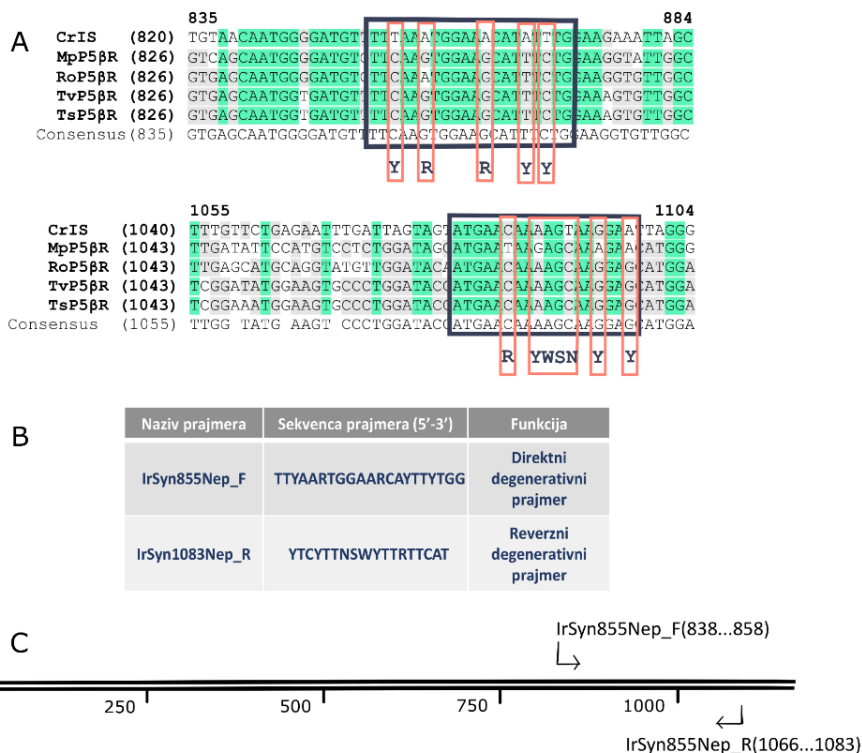
Slika 30. Promena relativne ekspresije pretpostavljenih gena za odabrane transkripcione faktore (*COI1*, *JAZ3*, *MYC2*, *MYB* i *YABBY5*) u (a) listovima *N. ratanjensis* (žuti stubići) i (b) *N. argolica* subsp. *argolica* (zeleni stubići) tokom dehidratacije nakon 1DPT, 3DPT i 6DPT. Dobijene vrednosti su normalizovane na *NrGAPDH* (a) ili *NaGAPDH* (b) i izražene relativno u odnosu na ekspresiju odgovarajućih gena u netretiranim biljkama (sivi stubići). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri biološka ponavljanja \pm standardna devijacija. Zvezdice (*) označavaju statističke značajnosti između vrednosti netretiranih i tretiranih biljaka (*unpaired t*-test, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$). Mape raspodele („toplotne mape“, eng. *heatmaps*) predstavljaju Pirsonove korelacije između vrednosti apsolutne kvantifikacije ekspresije gena biosintetskog puta nepetalaktona i odabranih transkripcionih faktora kod *N. ratanjensis* (c) i *N. argolica* subsp. *argolica* (d). Koeficijenti korelacije prikazani su u donjem trouglu, dok su statističke značajnosti ($p < 0,01$) obeležene zvezdicama na odgovarajućim mestima u gornjem trouglu. Svaki kvadrat označava Pirsonov koeficijent korelacije za par gena, dok je vrednost korelacionog koeficijenta predstavljen intenzitetom žute (pozitivne korelacije) ili sive boje (negativne korelacije) kod *N. ratanjensis*, ili zelene (pozitivne korelacije) i sive boje (negativne korelacije) kod *N. argolica* subsp. *argolica*, na šta ukazuje i skala obojenosti. Korelogram je određen na osnovu hijerarhijske klaster analize na distancionom matriksu (1 – korelacioni matriks: minimalna distanca za apsolutno pozitivno korelisane i maksimalna distanca za apsolutno negativno korelisane genske ekspresije). Klasterovanje je izvršeno pomoću metode najbližih elemenata (eng. *single-linkage*). Skraćenice: *COI1* – *Coronatine-insensitive 1*, *JAZ3* – *Jasmonate-ZIM domain*, *MYC2* – *Mouse-ear cress 2*, *MYB* – transkripcioni faktor sa *MYB* domenom, *YABBY5* – transkripcioni faktor iz porodice *YABBY*, *GPPS* – geranil difosfat sintaza, *GES* – geraniol sintaza, *G8O* – geraniol 8-oksidaza, *8HGO* – 8-hidroksigeraniol oksidoreduktaza, *IS* – iridoid sintaza, *NEPS* – kratkolančana dehidrogenaza bliska nepetalaktolu, *GAPDH* – glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenaza, *DPT* – dana PEG tretmana.

4.3. Identifikacija i funkcionalna karakterizacija gena koji kodiraju za iridoid sintazu (IS) u listovima vrsta roda *Nepeta*

Iz listova nekoliko vrsta roda *Nepeta* – *N. rtanjensis*, *N. ernesti-mayeri*, *N. parnassica*, *N. argolica* subsp. *argolica*, *N. sibirica* i *N. nervosa*, izolovani su geni kandidati za iridoid sintazu. Rekombinantni proteini su eksprimirani u *E. coli*, a zatim su usledili enzimski eseji *in vitro*, pomoću kojih su funkcionalno okarakterisane tri izoforme IS iz ovih vrsta.

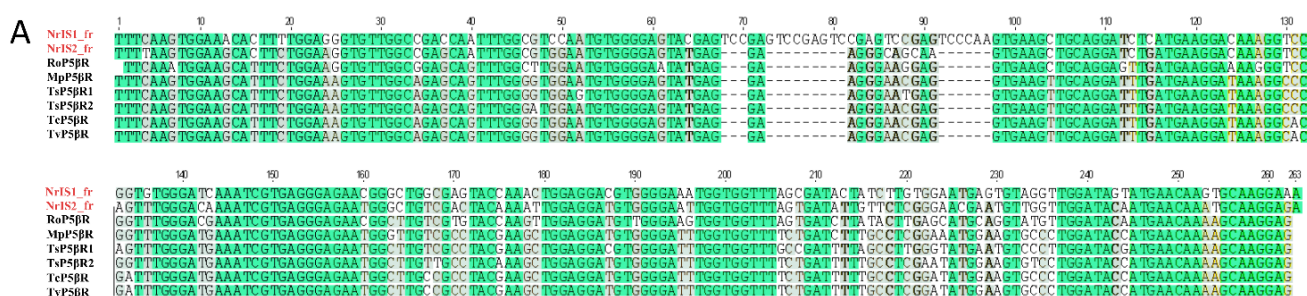
4.3.1. Izolacija fragmenta gena kandidata za iridoid sintazu iz glandularnih trihoma *N. rtanjensis*

Kako transkriptomaska baza podataka iz roda *Nepeta* nije bila dostupna u trenutku kada su otpočeli ovi eksperimenti, za identifikaciju i izolaciju pretpostavljenih gena za iridoid sintazu iz vrsta ovog roda primenjena je strategija bazirana na homologiji genskih sekvenci poreklom iz srodnih vrsta porodice Lamiaceae. Poređenje peptidne sekvence prve okarakterisane iridoid sintaze iz vrste *Catharanthus roseus* (CrIS) metodom BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*) sa NCBI (eng. *National Center for Biotechnology Information*) bazom podataka otkrilo je visok procenat sličnosti sa pretpostavljenim progesteron-5- β -reduktazama (P5 β R) iz različitih vrsta porodice Lamiaceae. Procenat sličnosti CrIS sa prvih pet najbližnjih sekvenci iznosio je 66–68%. Višestruko poravnanje sekvenci otkrilo je evolutivno konzervirane regione i na osnovu njih konstruisani su degenerativni prajmeri za izolaciju fragmenata gena kandidata za iridoid sintazu iz *N. rtanjensis* (Slika 31 A i 31 B). Na Slici 31 C prikazana je pozicija degenerativnih prajmera na genskoj sekvenci *CrIS*.



Slika 31. Dizajniranje degenerativnih prajmera za izolaciju fragmenta sekvence pretpostavljenog gena za IS iz *Nepeta* na osnovu homologije sekvenci iz srodnih vrsta porodice Lamiaceae. Višestruko poravnanje sekvenci *CrIS* i *P5 β R* iz različitih vrsta Lamiaceae otkriva konzervirane regione, na čijim pozicijama su konstruisani degenerativni prajmeri (A). Na slici su prikazane sekvence degenerativnih prajmera (B) i njihova pozicija na primeru genske sekvence *CrIS*. CrIS – iridoid sintaza iz *C. roseus*, MpP5 β R – pretpostavljena progesteron-5- β -reduktaza iz *Mentha piperita*, RoP5 β R – pretpostavljena progesteron-5- β -reduktaza iz *Rosmarinus officinalis*, TvP5 β R – pretpostavljena progesteron-5- β -reduktaza iz *Thymus vulgaris*, TsP5 β R – pretpostavljena progesteron-5- β -reduktaza iz *Thymus serpyllum*. Identifikacioni brojevi ovih sekvenci u NCBI bazi prikazani su na Slici 32.

Korišćenjem PCR tehnike sa degenerativnim prajmerima i cDNK izolata trihoma listova *N. rtanjensis* kao matrice, amplifikovan je fragment očekivane dužine. Nakon kloniranja fragmenta u *pGEM-T Easy* vektor i transformacije kompetentnih ćelija *Mach1 E. coli*, odabrano je deset bakterijskih kolonija iz kojih su plazmidi prečišćeni i poslani na sekvenciranje u kompaniju *Macrogen* (Amsterdam, Holandija). Rezultati sekvenciranja potvrdili su da su izolovane dve međusobno različite sekvence – jedna dužine 245 baznih parova (*NrIS1_fr*) i druga dužine 263 baznih parova (*NrIS2_fr*), koje su pokazivale visok stepen sličnosti sa *P5βR*-ama iz porodice Lamiaceae (**Slika 32 A**). Sličnost između ove dve sekvence iznosi 78,3%. Procenat sličnosti sekvence *NrIS1_fr* sa *P5βR* enzimima iz Lamiaceae iznosio je 82–85%, dok je *NrIS2_fr* pokazivala manju sličnost sa ovim sekvencama (71–74%) (**Slika 32 B**).



B

Naziv sekvence	Identifikacioni broj	Opis sekvence	Sličnost sa sekvencom <i>NrIS1_fr</i>	Sličnost sa sekvencom <i>NrIS2_fr</i>
<i>RoP5βR</i>	JQ894868.1	<i>Rosmarinus officinalis putative progesterone 5-β-reductase</i>	85%	73%
<i>TsP5βR1</i>	JX914656.2	<i>Thymus serpyllum putative progesterone 5-β-reductase 1</i>	84%	71%
<i>MpP5βR</i>	GU451677.1	<i>Mentha x piperita progesterone 5-β-reductase</i>	84%	74%
<i>TsP5βR2</i>	KF494250.1	<i>Thymus serpyllum putative progesterone 5-β-reductase 2</i>	82%	73%
<i>TcP5βR</i>	KF692116.1	<i>Thymus x citriodorus clone 1_3 putative progesterone 5β-reductase</i>	82%	73%
<i>TvP5βR</i>	JX029199.1	<i>Thymus vulgaris isolate P5βR1 putative progesterone 5-β-reductase</i>	82%	73%

Slika 32. Sekvenciranje otkriva dva različita fragmenta gena kandidata za iridoid sintazu iz trihoma listova *N. rtanjensis*. Višestruko poravnanje nukleotidnih sekvenci prikazuje sličnost fragmenta *NrIS1_fr* i *NrIS2_fr* sa sekvencama *P5βR* iz srodnih vrsta porodice Lamiaceae (A). Na slici je tabelarno prikazan procenat sličnosti *NrIS1_fr* i *NrIS2_fr* sa različitim *P5βR*, kao i nazivi i identifikacioni brojevi pod kojim su registrovane u bazi *NCBI* (B).

Otkriveni fragmenti dve sekvence gena za IS služili su kao matrica za pripremu novih setova prajmera sa ciljem otkrivanja start i stop kodona i izolacije punih dužina gena. Tehnike koje su za to upotrebljene su 5'-*RACE* i 3'-*RACE*, a kao matrica je ponovo korišćena cDNK iz glandularnih trihoma listova *N. rtanjensis*. Produkti 5'-*RACE* i 3'-*RACE* PCR-a uklonirani su u vektor *pTZ57RT*, a zatim su ovako dobijeni konstrukti sekvencirani. Rezultati sekvenciranja pokazuju da su pomoću ovih tehnika konačno otkriveni start (**Slika 33 A**) i stop kodoni (**Slika 33 B**) sekvenci, a potom su na osnovu njih konstruisani novi prajmeri za otkrivanje pune dužine potencijalnih gena za iridoid sintazu. Zbog razlike u jednom nukleotidu na 5'-kraju fragmenata otkrivenih 5'-*RACE* tehnikom konstruisan je degenerativni direktni prajmer, dok su na osnovu razlika na 3'-krajevima dizajnirane dve sekvence reverznih prajmera (**Slika 33 C**).

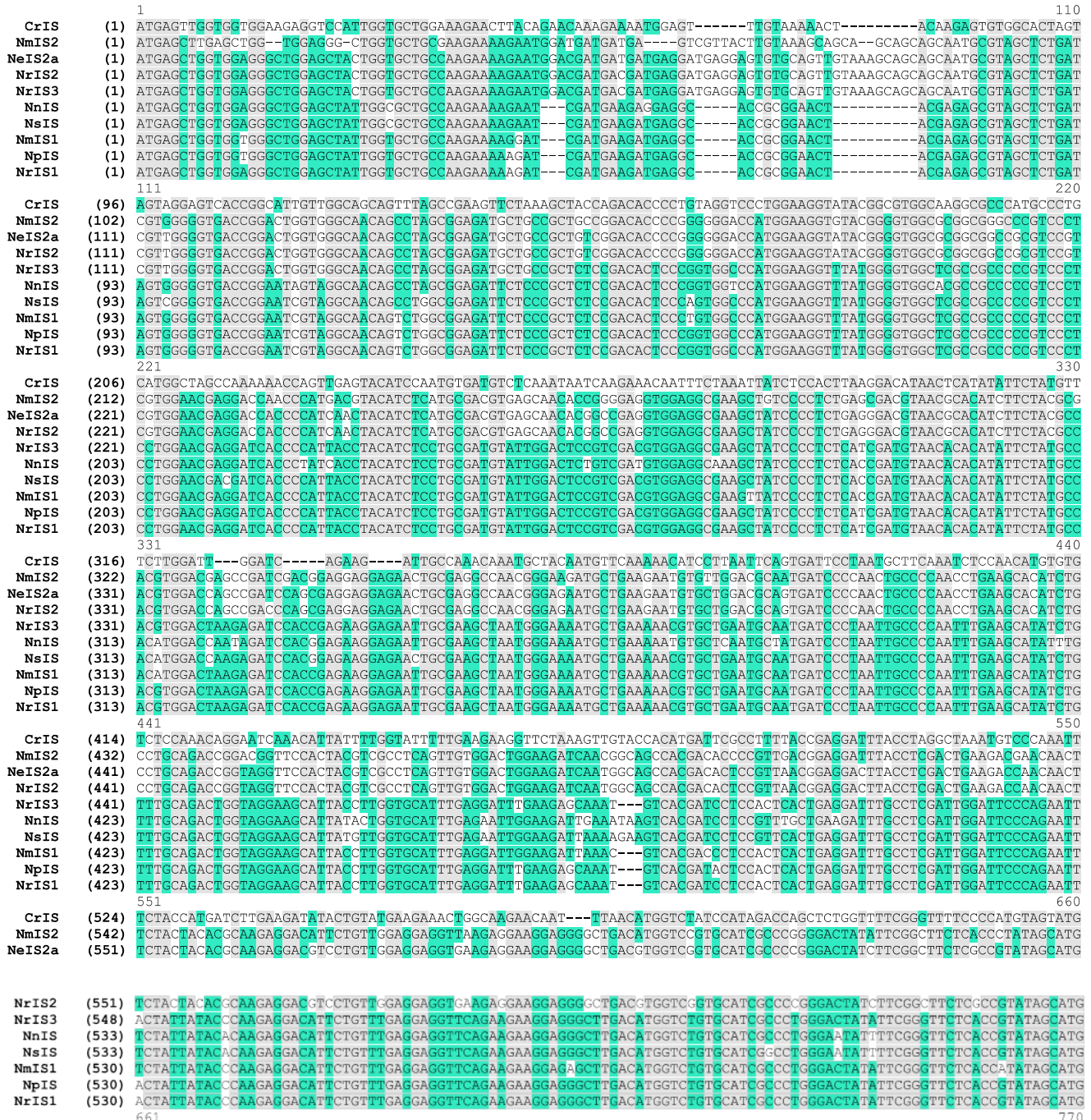


Slika 33. Otkrivanje start i stop kodona pretpostavljenih gena koji kodiraju za iridoid sintazu iz *N. rtanjensis*. Višestruko poravnanje sekvenci pokazuje da je pomoću 5'-RACE tehnike otkriven start kodon (A), dok je sekvenciranje proizvoda 3'-RACE PCR-a pronašlo stop kodon (B) gena kandidata za IS iz trihoma listova *N. rtanjensis*. Crveni pravougaonici obeležavaju pozicije prajmera za izolaciju pune dužine gena. Sekvence degenerativnog direktnog i dva reverzna prajmera za izolaciju pune dužine gena kandidata su prikazane u tabeli (C). RoP5βR – pretpostavljena progesteron-5-β-reduktaza iz *R. officinalis*.

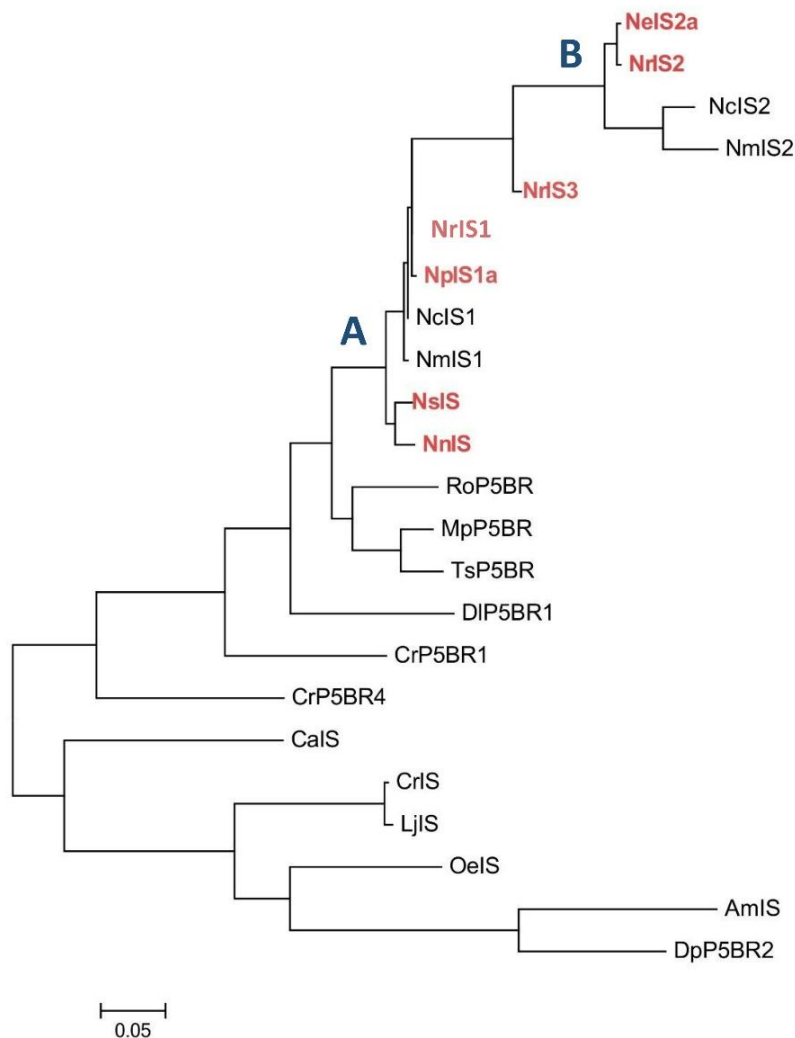
4.3.2. Izolacija punih dužina gena za iridoid sintazu iz nekoliko vrsta roda *Nepeta* i njihova filogenetska analiza

Sekvenciranje je utvrdilo da izolovane gene iz glandularnih trihoma listova *N. rtanjensis* čine ORF-ovi (eng. *open reading frame*) od 1164 i 1203 baznih parova, koji su označeni kao NrIS1, odnosno NrIS2. PCR tehnika sa prajmerima za amplifikaciju pune dužine gena rezultirala je proizvodima očekivanih dužina i kada su kao matrice korišćene cDNK iz listova *N. argolica* subsp. *argolica*, *N. ernesti-mayeri*, *N. parnassica*, *N. sibirica* i *N. nervosa*. Veliki broj kloniranih sekvenci iz šest vrsta *Nepeta* upoređen je višestrukim poravnanjem aminokiselinskih sekvenci na osnovu čega je ustanovljeno da se one mogu svesti na sedam različitih izoformi. Pri tom, sekvenca koja je obeležena kao NrIS1 izdvojena je kao predstavnik visoko konzerviranih sekvenci potvrđenih i u listovima *N. argolica* subsp. *argolica* (NaIS1), *N. parnassica* (NpIS1) i *N. ernesti-mayeri* (NeIS1). S druge strane, sekvence identične NrIS2 takođe su izolovane iz *N. argolica* subsp. *argolica* (NaIS2) i *N. ernesti-mayeri* (NeIS2), ali ne i iz *N. parnassica*. Sekvenca NrIS3, dužine 1203 baznih parova, detektovana je samo u *N. rtanjensis*. Međusobno identične sekvence, po aminokiselinskom nizu najslblije sa NrIS2, potvrđene su u dve vrste, *N. ernesti-mayeri* (NeIS2a) i *N. parnassica* (NpIS2a). Dužina genske sekvence *NeIS2a* iznosi 1206 baznih parova. Kao potencijalna iridoid sintaza, izdvojena je i sekvenca koja se od NaIS1 razlikuje u samo jednoj amino kiselini i pronađena je samo u vrsti *N. parnassica*, te nosi naziv NpIS, a dužina genske sekvence je 1167 baznih parova. NsIS je izoforma koja je evidentirana samo u listovima *N. sibirica*, dok je NnIS detektovana samo u vrsti *N. nervosa*. Nukleotidne sekvence *NsIS* i *NnIS* su istih dužina i iznose 1170 baznih parova. Nakon izolacije punih

dužina sekvenci IS na opisan način, sekvenciran je transkriptom listova *N. rlanjensis*, u kom su potvrđene sekvence *NrIS1* i *NrIS2*, ali ne i *NrIS3*. Na **Slici 34.** je prikazano višestruko poravnanje sekvenci, na kom se uočava sedam predstavnika izolovanih gena kandidata za IS iz *Nepeta*, kao i poznate sekvence iz *N. mussinii* (*NmIS1* i *NmIS2*) i *C. roseus* (*CrIS*).



Izoforme NeIS2a i NrIS2 najrodnije su okarakterisanim iridoid sintazama iz *N. cataria* (NcIS2) i *N. mussinii* (NmIS2) (Sherden i sar., 2017) (**Slika 35 B**). S druge strane, NaIS1, NpIS1a, kao i NnIS i NsIS, formiraju posebnu granu sa izoformama familije 1 poreklom iz *N. cataria* (NcIS1) i *N. mussinii* (NmIS1) (**Slika 35 A**). Sekvenca NrIS3 izdvaja se od drugih i zauzima poziciju između dve grupe iridoid sintaza iz *Nepeta*.



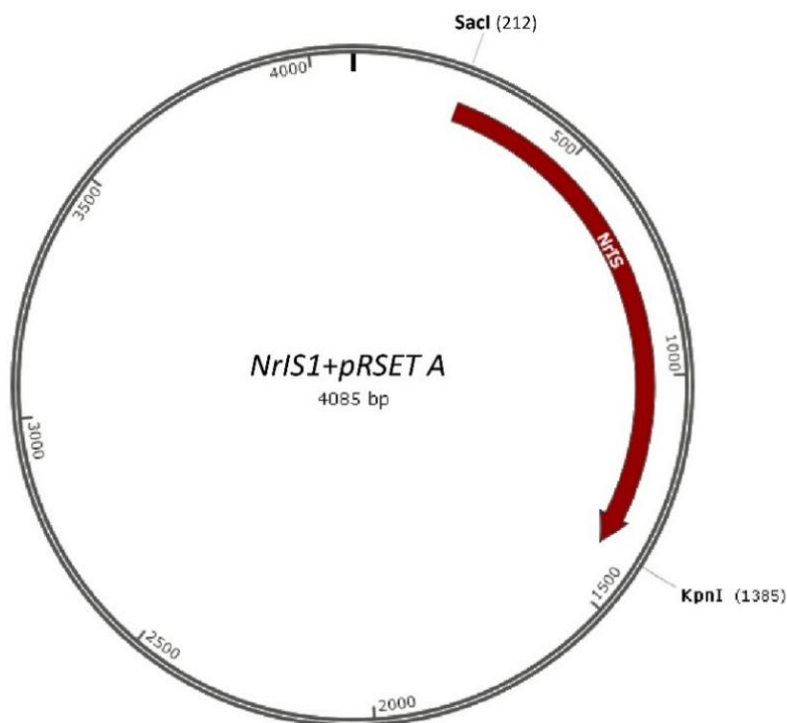
Slika 35. Filogenetska analiza aminokiselinskih sekvenci pretpostavljenih IS iz *Nepeta*, okarakterisanih IS iz različitih vrsta, kao i pretpostavljenih P5 β R iz vrsta porodice Lamiaceae. Crvenom bojom su obeležene pretpostavljane IS iz *Nepeta*, koje su otkrivene u ovoj disertaciji. Izdvojena su dva klastera sa IS iz *Nepeta*, koja sadrže sekvence iz familije 1 (A) i iz familije 2 (B). Višestruko poravnanje sekvenci izvršeno je pomoću programa *Clustal W* iz softverskog paketa *MEGA* verzija 6.0. Za trimovanje divergentnih regiona višestrukog poravnanja sekvenci i dobijanje visoko konzerviranih blokova, korišćen je program *Gblocks* verzija 0.91b. Filogenetska analiza konzerviranog bloka izvršena je pomoću metode najveće verovatnoće (eng. *maximum likelihood*) u programu *MEGA* 6.0. Opisi skraćenica naziva proteinskih sekvenci i njihovi identifikacioni brojevi u *NCBI* bazi prikazani su u tabeli (Prilog, **Tabela P1.**)

4.3.3. Funkcionalna *in vitro* karakterizacija iridoid sintaza iz vrsta roda *Nepeta* eksprimiranih u bakteriji *E. coli*

Filogenetski odnosi prethodno okarakterisanih IS sa genima izolovanim u okviru ove disertacije ukazuju na visok stepen međusobne homologije. Samo filogenetsko grupisanje, međutim, ne predviđa sa

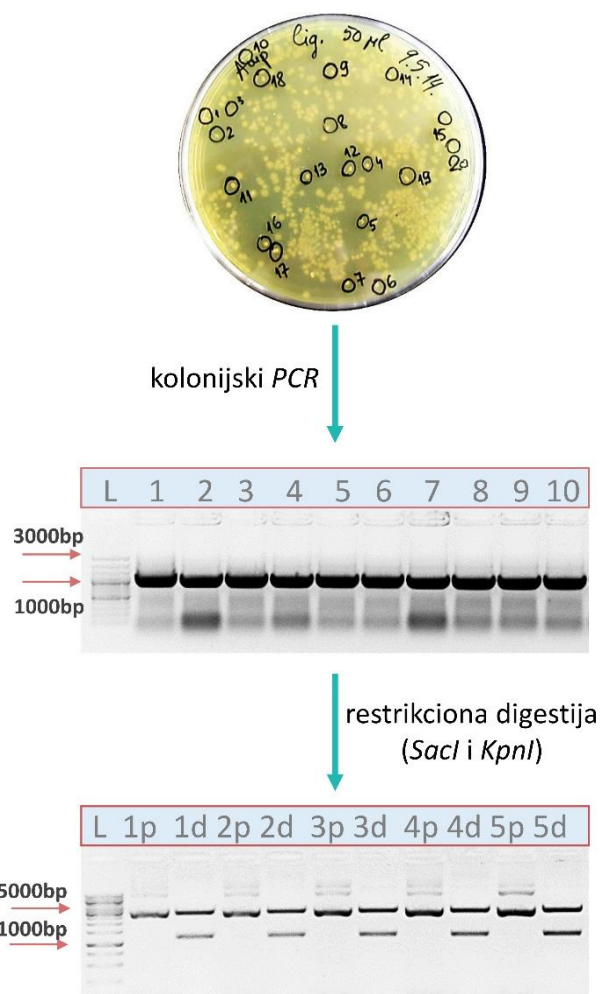
apsolutnom sigurnošću katalitičku aktivnost enzima, koje kodiraju izolovane nukleotidne sekvence. Dodatno, iridoid sintaze pripadaju „promiskuitetnoj” grupi enzima, zajedno sa progesteron-5- β -reduktazama (*PRISE*), sa kojima su strukturno i funkcionalno veoma bliske, što dodatno čini nepouzdanim predviđanje aktivnosti izolovanih izoformi isključivo na osnovu filogenetske analize. Zbog toga je nakon izolacije opisanih gena, njihove heterologe ekspresije u *E. coli* i prečišćavanja rekombinantnih proteina, analizirana funkcija enzima u enzimskim esejima *in vitro*, a struktura produkata reakcija je potvrđena pomoću *GC-MS* i NMR analiza.

U cilju funkcionalne karakterizacije korišćeni su bakterijski sistemi *E. coli*, u kojima su ekspimirani rekombinantni proteini. Konstruktima sačinjenim od sedam predstavnika izolovanih sekvenci (*NaIS1*, *NpIS1a*, *NrIS2*, *NeIS2a*, *NrIS3*, *NnIS* i *NsIS*) ukloniranih u vektor *pRSET-A* (Slika 36.), transformisani su sojevi *E. coli* *BL21(DE3)*.



Slika 36. Pretpostavljeni izgled konstrukta sačinjenog od gena kandidata *NrIS1* i ekspresionog vektora *pRSET A*. Veličina konstrukta iznosi 4085 baznih parova. Na slici je crvenom strelicom obeležena pozicija i orijentacija gena kandidata *NrIS1* u konstruktu i restrikciona mesta *SacI* i *KpnI*, koja su korišćena za inserciju gena kandidata. Prikaz konstrukta izvršen je pomoću programa *SnapGene* verzija 5.0.

Za potvrdu uspešnosti transformacije korišćena je tehnika kolonijski *PCR* sa prajmerima za punu dužinu gena kandidata za IS, tako da je očekivana dužina amplikona iznosila ~1200 baznih parova (Slika 37.). Plazmidi su izolovani iz kolonija, u kojima je *PCR* tehnikom potvrđeno prisustvo inserata. Nakon toga, korišćena je dijagnostička digestija restrikcionim enzimima *SacI* i *KpnI*, kako bi se dodatno proverila uspešnost kloniranja, i odabrane linije su indukovane na ekspresiju.

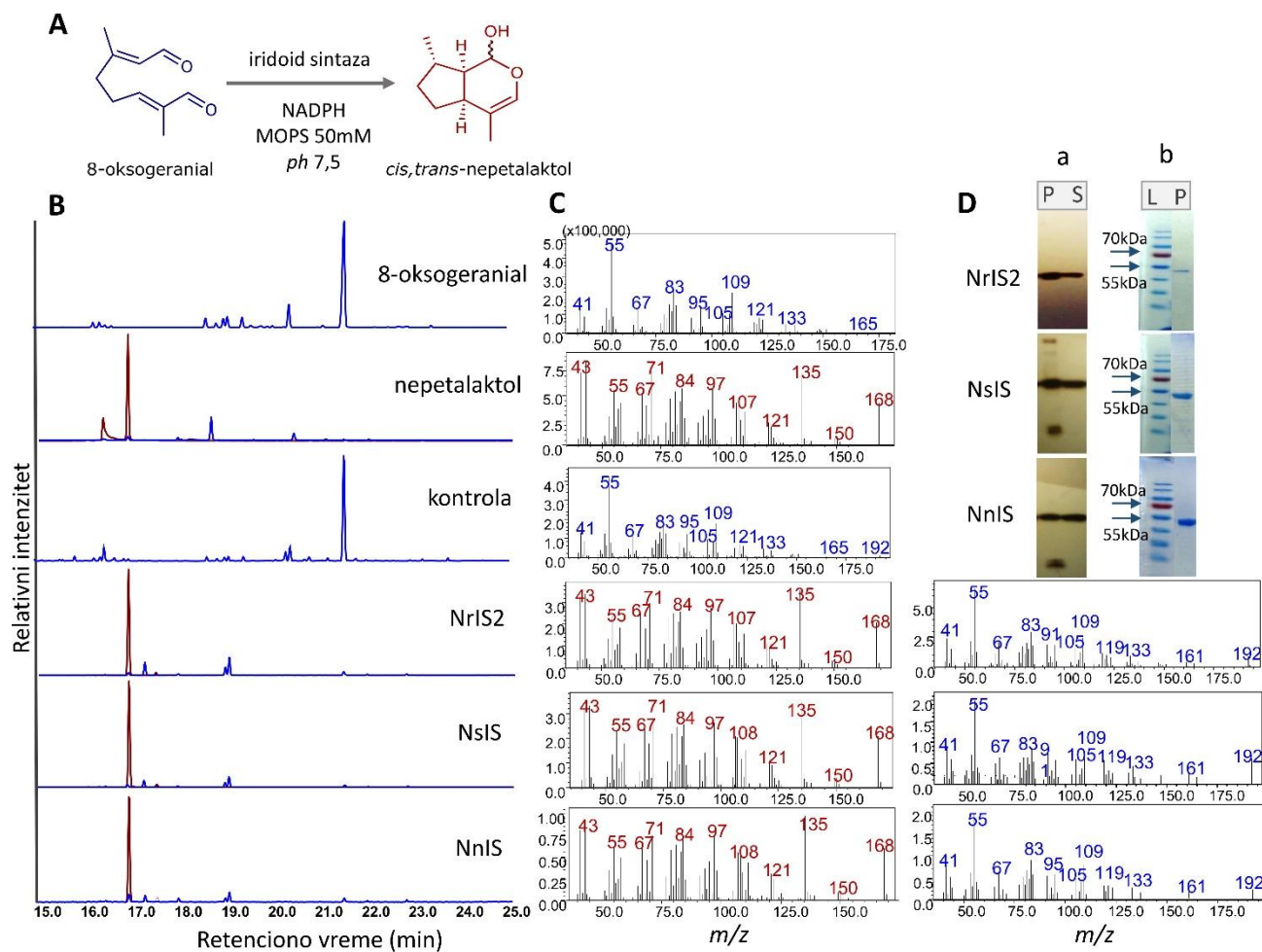


Slika 37. Šematski prikaz provere uspešnosti kloniranja pomoću tehnike kolonijski *PCR* i digestije restrikcionim enzimima. Deset kolonija *BL21(DE3)*, transformisanih konstruktom sačinjenim od *pRSETA* i *NrIS1*, odabrano je za kolonijski *PCR*. Na slici agaroznog gela (gore) uočava se amplicon očekivane dužine (~1200 baznih parova) u svim testiranim kolonijama. Nakon toga, odabrano je prvih pet kolonija iz kojih su izolovani plazmidi i izvršena je restrikciona digestija sa enzimima *SacI* i *KpnI*. Na agaroznom gelu (dole) prikazani su celi izolovani plazmidi (obeleženi 1p, 2p, 3p, 4p i 5p) i isti plazmidi nakon digestije (1d, 2d, 3d, 4d i 5d). Inerti dužine ~1200 baznih parova uočavaju se u svim plazmidima nakon digestije, kao i linearizovani vektor dužine 2897 baznih parova. L- DNK marker.

Kako bi se heterologom ekspresijom u *E. coli* dostigao visok prinos rekombinantnih proteina neophodno je bilo pronaći optimalne uslove gajenja bakterijskih kultura variranjem različitih parametara, kao što su temperatura, koncentracija IPTG kojom je reakcija indukovana, vreme inkubacije nakon indukcije i brzina kretanja rotacione mešalice. Analiziranjem rezultata bakterijske ekspresije pod različitim uslovima utvrđeno je da je najveća produktivnost eksprimiranih proteina dobijena kada su korišćeni uslovi opisani u poglavlju Materijal i metode (odjeljak **2.4.2.10**). Nakon dobijanja visokog prinosa rekombinantnih proteina, izvedeno je afinitetno prečišćavanje proteina sa histidinskim obeleživačem. Analize *SDS-PAGE* i bojenje *Coomassie Brilliant Blue*, kao i imunoblot detekcija rekombinantnih proteina sa anti-His antitelima potvrdili su prisustvo jedne glavne trake očekivane dužine monomera od 42 kD (**Slika 38 D**).

Reakcione enzimske smeše sa rekombinantnim proteinima u prisustvu 8-oksogeraniala kao supstrata i kofaktora NADPH, kao i kontrolni esej koji nije sadržao proteine od interesa, ekstrahovane

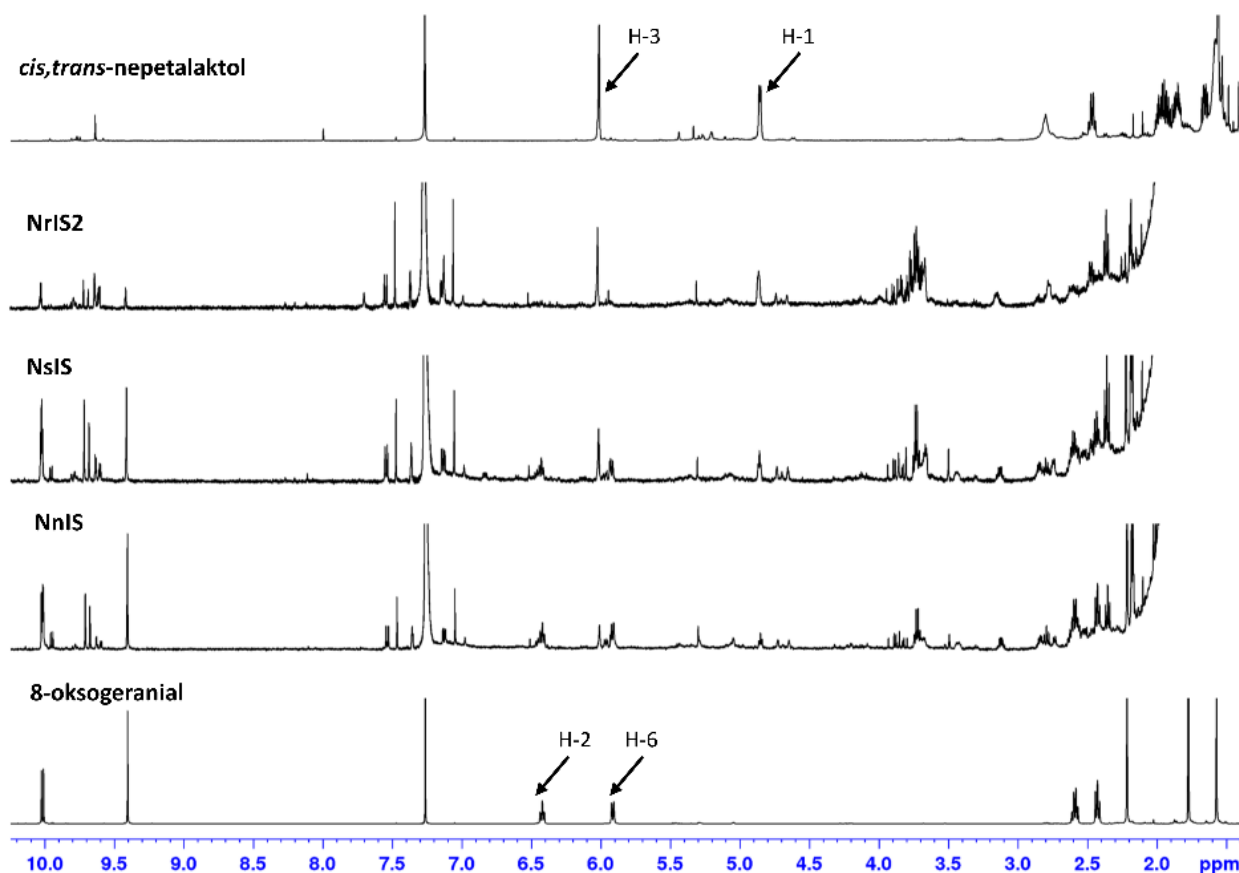
su u heksanu i analizirane pomoću *GC-MS* analize. Poređenjem *GC-MS* spektara i retencionih indeksa komercijalnog 8-oksogeraniala i *cis,trans*-nepetalaktola, kao i *Wiley* baze podataka masenih spektara (*Registry of Mass Spectral Data, Palisade Corporation, Newfield, NY, SAD*), sa spektrima kontrolnog esaja i esaja sa enzimom, identifikovani su pikovi koji odgovaraju standardima (**Slika 38 B**). Maseni spektri jedinjenja iz reakcionih smeša, koja odgovaraju 8-oksogeranialu i *cis,trans*-nepetalaktolu, pokazuju fragmentacione profile karakteristične za masene spektre standarda. *GC-MS* hromatogrami kontrolne reakcije, kao i reakcionih smeša sa enzimima NrIS1, NpIS1a, NrIS3 i NeIS2a, prikazivali su samo pik koji odgovara 8-oksogeranialu (rezultat nije prikazan). S druge strane, u esejima sa NrIS2, NsIS i NnIS, pored 8-oksogeraniala, javlja se pik koji odgovara *cis,trans*-nepetalaktolu (**Slika 38 B i 38 C**).



Slika 38. *GC-MS* analiza enzimskih *in vitro* esaja sa rekombinantnim enzimima NrIS2, NsIS i NnIS. Prkazana je enzimaska reakcija, u kojoj iridoid sintaza konvertuje 8-oksogeranial do *cis,trans*-nepetalaktola u puferu sa MOPS koncentracije 50mM i pH 7,5 (A). Upoređeni su ekstrahovani *GC-MS* hromatogrami za mase 166 i 168 *m/z*, standarda 8-oksogeraniala i *cis,trans*-nepetalaktola sa hromatogramima *in vitro* esaja bez enzima (kontrola) i onih sa rekombinantnim enzimima NrIS2, NsIS i NnIS (B). Retenciono vreme pika koji odgovara nepetalaktolu je $R_t=16,9$ min, a 8-oksogeranialu $R_t=21,5$ min. Plavom bojom obeleženi su pikovi koji odgovaraju masama 166 *m/z*, dok su crvenom bojom obojeni pikovi masa 168 *m/z*. Na slici su takođe prikazani maseni spektri (C) koji odgovaraju pikovima sa hromatograma levo sa $R_t=16,9$ min (crveno) i 21,5 min (plavo). Imunoblot (a) i *SDS-PAGE* (b) pokazuju da su izolovani proteini NrIS2, NsIS i NnIS veličine 42 kDa monomera (D). P – označava uzorak insolubilnih proteina, S – solubilni proteini; L – proteinski marker, P – prečišćeni rekombinantni proteini

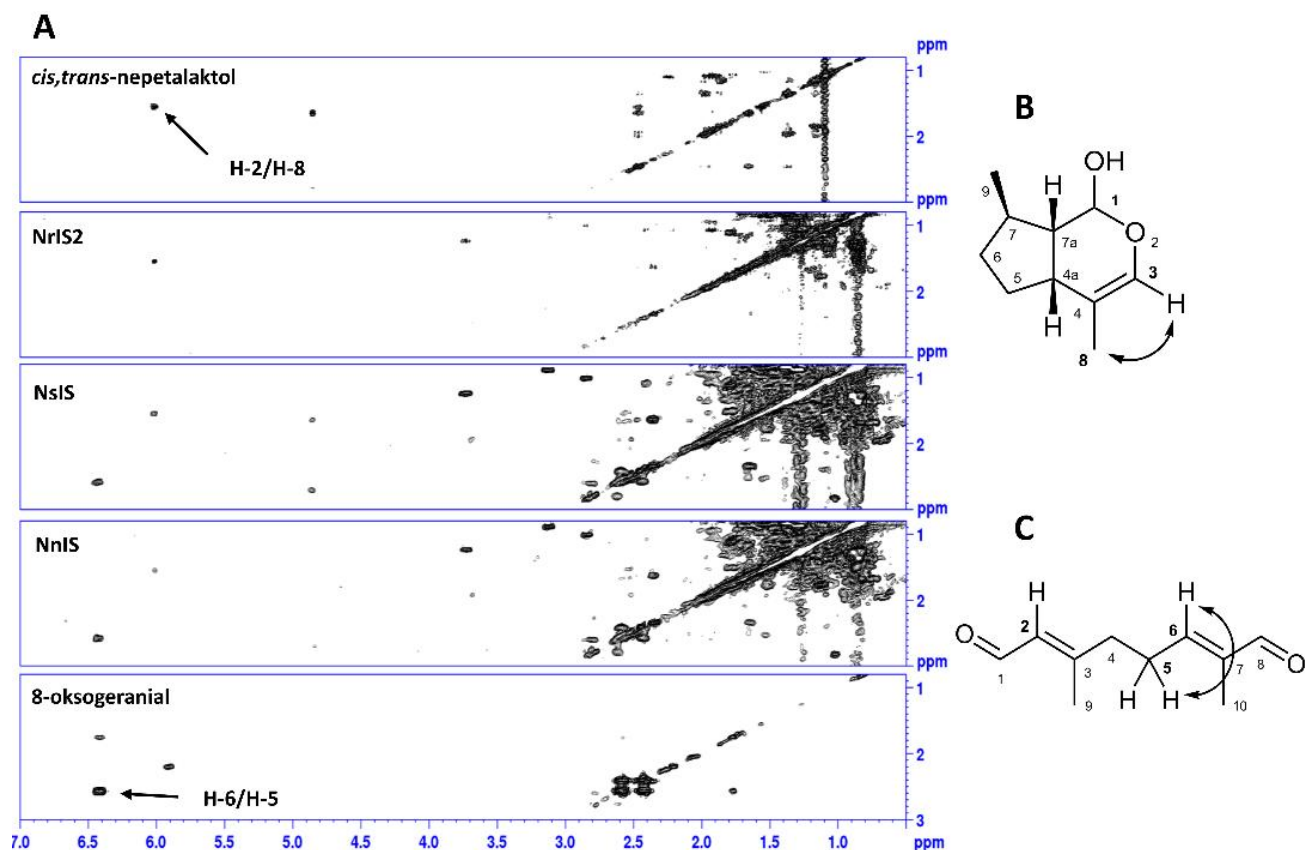
GC-MS analiza ukazala je na stvaranje nepetalaktola u reakcijama koje su katalizovali rekombinantni enzimi NrIS2, NsIS i NnIS, a na osnovu poređenja masenih spektara proizvoda reakcija

sa standardom *cis,trans*-nepetalaktola. Kako je i dalje nepoznato u kom koraku biosinteze nepetalaktona dolazi do njegove izomerizacije neophodno je bilo detaljnije ispitati strukturu dobijenih proizvoda reakcije. Strukturna karakterizacija jedinjenja proizvedenih aktivnostima enzima NrIS2, NsIS i NnIS postignuta je pomoću NMR analize. Nakon uparavanja heksana, u kome su ekstrahovani produkti enzimskih reakcija, rezidue reakcija i čista jedinjenja 8-oksogeranial i nepetalaktol rastvoreni su u CDCl_3 i analizirani su NMR spektroskopijom. Dobijeni rezultati ^1H NMR spektara proizvoda reakcija sa NsIS i NnIS prikazuju jasno izdvajanje pikova karakterističnih za *cis,trans*-nepetalaktol (H-3, 6,01 i H-1, 4,85 ppm) i 8-oksogeranial (H-6, 6,42 i H-2, 5,91 ppm). U proizvodu reakcije, koju je katalizovao enzim NrIS2, ^1H NMR spektari ukazuju samo na prisutvo pikova *cis,trans*-nepetalaktola, dok je koncentracija 8-oksogeraniala ispod nivoa detekcije primenjene spektroskopske tehnike (**Slika 39.**).



Slika 39. ^1H NMR spektri metanolnih ekstrakata standarda *cis,trans*-nepetalaktola i 8-oksogeraniala, kao i produkata enzimskih esej sa NrIS2, NsIS i NnIS. Strelicama su obeleženi karakteristični pikovi *cis,trans*-nepetalaktola (H-3, 6,01 i H-1, 4,85 ppm) i 8-oksogeraniala (H-6, 6,42 i H-2, 5,91 ppm). Pikovi *cis,trans*-nepetalaktola uočavaju se kod NrIS2, NsIS i NnIS, dok se pikovi karakteristični za 8-oksogeranial ne zapažaju samo kod proizvoda esej sa NrIS2.

Prisustvo *cis,trans*-nepetalaktola i 8-oksogeraniala koji su nastali u reakcijama sa enzimima NrIS2, NsIS i NnIS, dodatno je potvrdila $2\text{D } ^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY NMR spektroskopska tehnika. Izolovane korelacije H-3/H-8 (6,01/1,55 ppm) *cis,trans*-nepetalaktola H-6/H-5 (6,42/2,60 ppm) i 8-oksogeraniala potvrdili su rezultate ^1H NMR analize (**Slika 40.**).

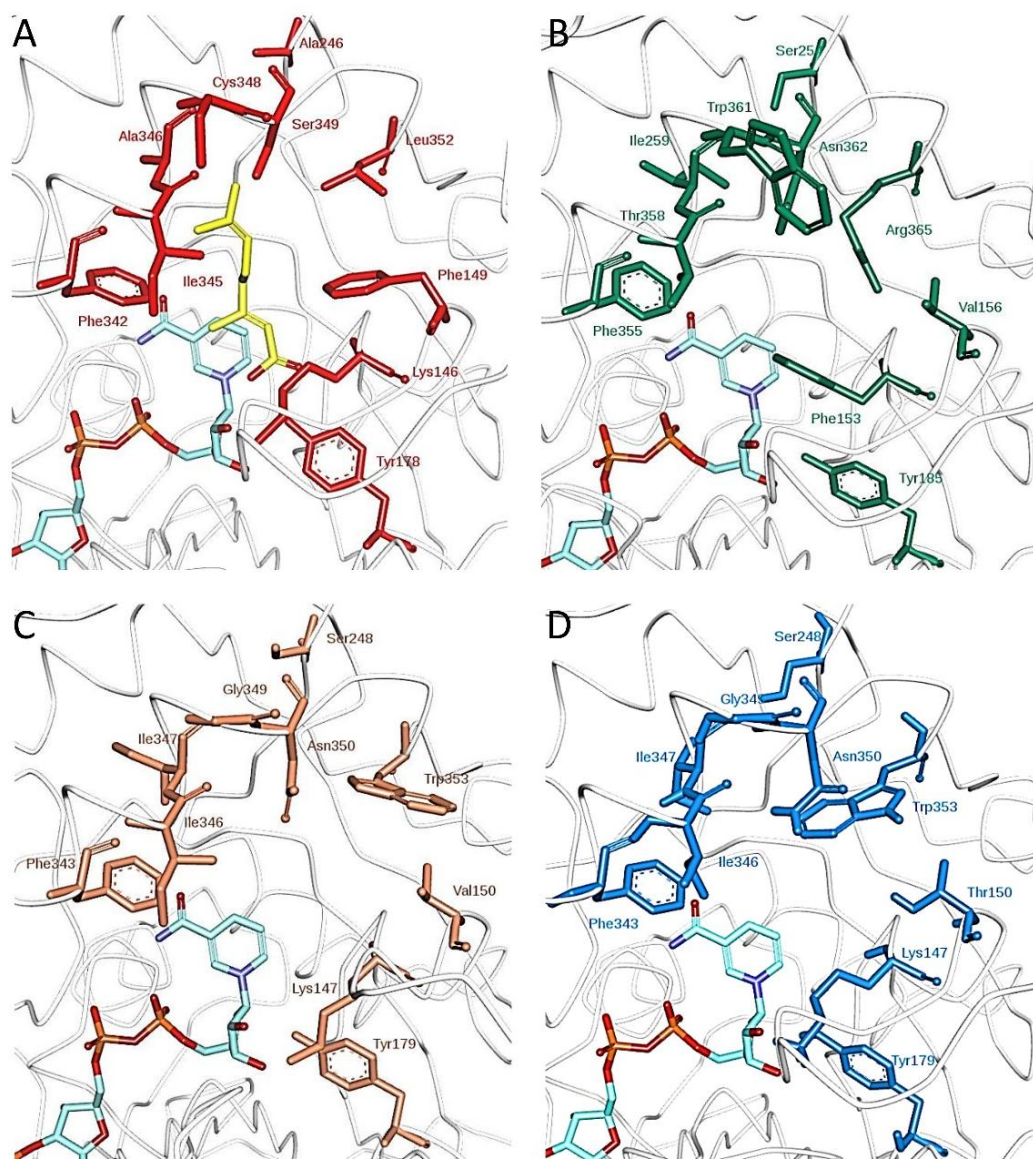


Slika 40. 2D ^1H - ^1H COSY-NMR spektri metanolnih ekstrakata *cis,trans*-nepetalaktola, 8-oksogeraniala i *in vitro* enzimskih esesa sa rekombinantnim NrIS2, NsIS i NnIS (A). Strelicama su označeni korelacije H-3/H-8 (6,01/1,55 ppm) *cis,trans*-nepetalaktola i H-6/H-5 (6,42/2,60 ppm) 8-oksogeraniala. Spektri prikazuju prisustvo korelacije poreklom od protona H-5 sa protonom H-6 iz 8-oksogeraniala kod NsIS i NnIS, dok korelacije pikoha protona H-3 i H-8 *cis,trans*-nepetalaktola zapažaju u proizvodima esesa sa svim analiziranim rekombinantnim IS enzimima. Na slici su prikazane najintenzivnije COSY korelacije kod *cis-trans*-nepetalaktola (B) i 8-oksogeraniala (C).

4.3.4. Analiza strukturnih razlika u aktivnim mestima funkcionalno okarakterisanih iridoid sintaza iz tri vrste *Nepeta* (NrIS2, NsIS i NnIS) i poznatih IS iz različitih vrsta

Poravnanjem sekvenci otkriveno je prisustvo šest motiva karakterističnih za P5 β R u IS izolovanim iz vrsta roda *Nepeta* (Thorn i sar., 2008, Bauer i sar. 2010) (Slika 41). Motiv I (GxTGIxG) je identičan kod sekvenci iz familije 1, NnIS i NsIS, dok se u familiji 2 i NrIS3 javlja razlika u jednoj aminokiselini – L40. Motiv II (GxxRR) je neizmenjen kod svih analiziranih sekvenci. U odnosu na sekvencu motiva III (DxxD) odstupanja se nalaze kod NmIS2, NrIS2 i NeIS2a, gde je na poziciji 87 asparagin (N). Kod sekvenci familije 2 javljaju se razlike u motivu IV (TGxKHYxGP), tako što je K146 zamenjen fenilalaninom. Sekvence familije 1 i NrIS3 umesto fenilalanina imaju Y177 u okviru motiva V (NFYYxxED). Kod svih analiziranih sekvenci nema odstupanja u Motivu VI (WSVHRP). Pozicije sa aminokiselinskim ostacima, koji su značajni za aktivnost iridoid sintaza (Kries i sar., 2016), identifikovane kod sekvenci iz *Nepeta*, obeležene su crvenim zvezdicama na prikazu poravnanja sekvenci (Slika 41.) i izdvojene u tabeli prikazanoj na Slici 42. Svi ostaci su obeleženi u odnosu na pozicije u sekvenci CrIS.

Kako bi bile ustanovljene strukturne razlike između tri funkcionalno okarakterisane iridoid sintaze iz različitih vrsta metvica, konstruisani su njihovi 3D modeli. Početne 3D strukture enzima su dobijene korišćenjem programa *MODELLER* (Yang i sar., 2012.), a potom je urađeno *Rosetta all-atom* modelovanje (Alford i sar., 2017). Više informacija o konformacionom prostoru, koje zauzimaju izmodelovane strukture, dobijene su grupisanjem, odnosno klasterovanjem, prema strukturnoj sličnosti. Na osnovu homologije sa kristalnom strukturom CrIS (*PDB* kod 5DF1, Ref. 25) konstruisani su modeli NrIS2, NsIS i NnIS. Pomoću strategije bazirane na homologiji sa CrIS (**Slika 42 A**) modelovane su strukture aktivnih mesta NrIS2 (**Slika 42 B.**), NsIS (**Slika 42 C.**) i NnIS (**Slika 42 D.**) i izdvojeni su aminokiselinski ostaci značajni za katalitičku aktivnost IS, kao i za stereoselektivnost kod AmIS (Kries i sar., 2016, 2017). Pošto je uočen visok nivo sličnosti aminokiselinskih sekenci (~60%) između CrIS i tri sekvence IS iz metvica, može se pretpostaviti da modeli verodostojno prikazuju aktivna mesta NrIS2, NsIS i NnIS. Aminokiselinski ostaci, za koje je potvrđeno da su značajni za katalitičku aktivnost IS i stereoselektivnost kod AmIS, izdvojeni su na **Slici 42 E.** Sekvence NmIS2 i NrIS2 na poziciji 146 imaju fenilalanin umesto lizina konzerviranog kod drugih sekvenci iz grupe *PRISE*. Ostatak F149 kod CrIS zamenjen je valinom (V) u potvrđenim IS iz *Nepeta*, izuzev NsIS, kod koje se na toj poziciji nalazi treonin (T). Veoma konzervirani ostatak – Y178, uočava se kod svih analiziranih sekvenci. Sve poznate sekvence IS iz roda *Nepeta* imaju polarni serin (S) na poziciji na kojoj se kod CrIS nalazi hidrofobni alanin (A246). Kod AmIS, konzervirani ostatak F342 zamenjen je leucinom (L). Na poziciji 345 se nalazi nepolarni izoleucin (I) kod NsIS i NnIS, dok je ova aminokiselina zamenjena valinom kod AmIS i NmIS1, a kod NmIS2 i NrIS2 polarnim treoninom (T). Ostatak A346 je kod potvrđenih IS iz *Nepeta* zamenjen izoleucinom (I), dok se na tom mestu kod NmIS1 nalazi leucin (L), a kod AmIS valin (V). Kod svih sekenci iz *Nepeta* i AmIS asparagin (N) je zamenio S349. Nepolarni L352 je zamenjen nepolarnim aromatičnim triptofanom (W) kod NmIS1, NsIS i NnIS, kod NmIS2 i NrIS2 polarnim argininom (R), a kod AmIS polarnim treoninom (T) (**Slika 42 E.**). Uočava se da su funkcionalno značajni aminokiselinski ostaci identični kod NrIS2 i NmIS2, kao i da se NsIS i NnIS razlikuju samo na jednoj poziciji i sličiji su sa familijom 1 IS iz roda *Nepeta*.



E

	146	149	178	246	342	345	346	349	352
CrIS	K	F	Y	A	F	I	A	S	L
AmIS	K	W	Y	W	L	V	V	N	T
NmIS1	K	L	Y	S	F	V	L	N	W
NmIS2	F	V	Y	S	F	T	I	N	R
NrIS2	F	V	Y	S	F	T	I	N	R
NsIS	K	V	Y	S	F	I	I	N	W
NnIS	K	T	Y	S	F	I	I	N	W

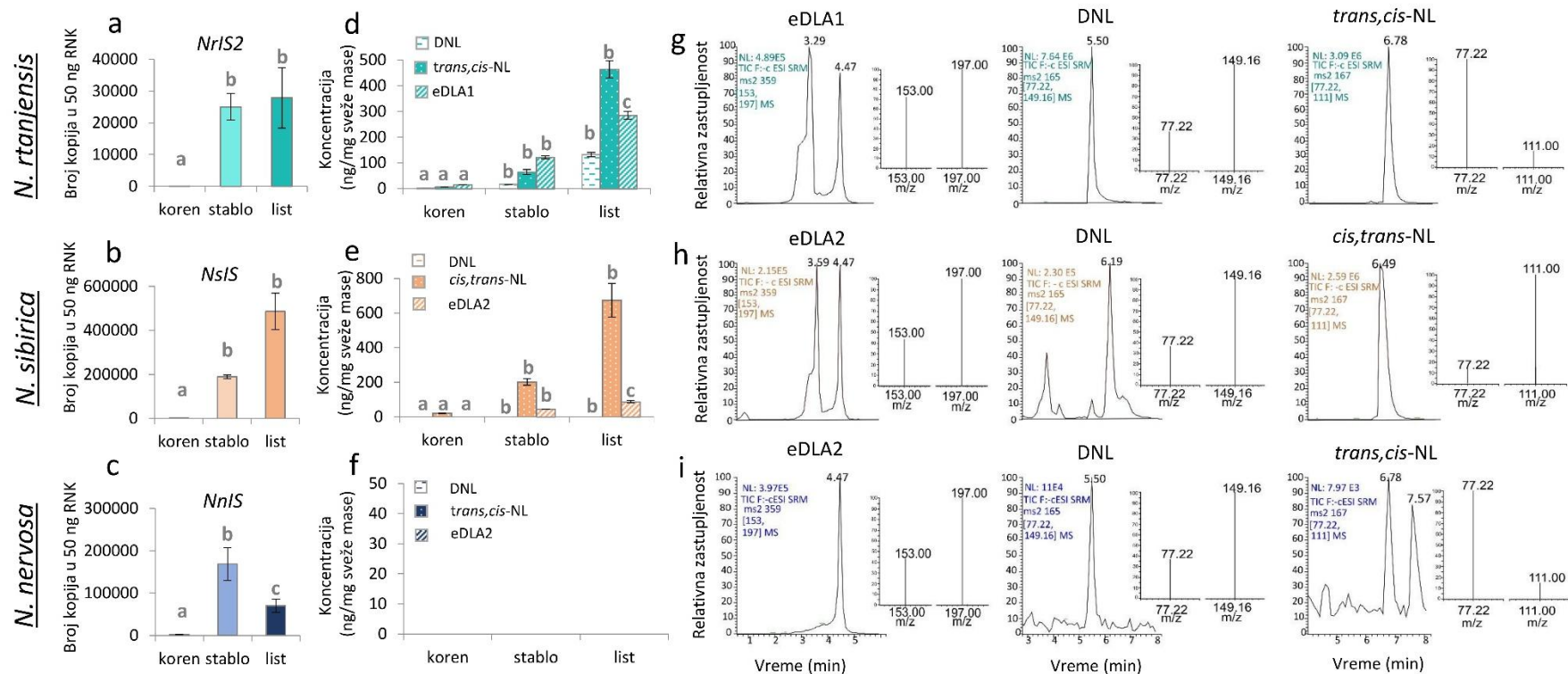
Slika 42. Poređenje 3D modela polipeptida i aktivnih mesta enzima CrIS sa NrIS2, NsIS i NnIS. Predstavljene su strukturne razlike aktivnih mesta CrIS (A), NrIS2 (B), NsIS (C) i NnIS (D). Modeli su konstruisani na osnovu homologije sa kristalnom strukturom CrIS (PDB kod 5DF1, Ref. 25) sa geraničnom kiselinom (GEA, žuto) i NADP⁺ (svetloplavo). Proteinske kičme su obojene sivom bojom, dok su aminokiselinski ostaci značajni za katalitičku aktivnost iridoid sintaza obojeni crvenom (CrIS – EA), zelenom (NrIS2 – B), narandžastom (NsIS – C) i plavom bojom (NnIS – D). Tabela sa razlikama u vezujućim domenima iridoid sintaza iz različitih vrsta prikazana je u odnosu na pozicije u sekvenci CrIS

4.3.5. Poređenje ekspresija funkcionalno okarakterisanih IS kod vrsta roda *Nepeta* koje ne proizvode i kod onih koje dominantno proizvode različite stereoizomere NL

Pomoću *UHPLC/DAD/(±)HESI-MS/MS* analize u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* identifikovani su *trans,cis*-NL, *cis,trans*-NL, DNL, epideoksiloganinska kiselina (*eDLA1*) i izomer epideoksiloganinske kiseline (*eDLA2*). Prisustvo ovih jedinjenja u uzorcima utvrđeno je pretragom masa njihovih pseudomolekularnih jona $[M+H]^+$ i poređenjem MS^2 obrazaca fragmentacije sa standardima. *UHPLC/MS^2* hromatogrami metanolnih ekstrakata *N. rtanjensis* ukazali su na prisustvo *trans,cis*-NL pseudomolekularnim jonom $[M+H]^+$ od 167 *m/z*, na $R_t=6,78$ min, DNL sa pseudomolekularnim jonom $[M+H]^+$ 165 *m/z* na $R_t=5,5$ min, kao i *eDLA1* sa $[M+H]^+$ 359 *m/z* na $R_t=4,47$ min (**Slika 43 g**). Analiza metanolnih ekstrakata *N. sibirica* otkrila je *cis,trans*-NL sa očekivanim $[M+H]^+$ od 167 *m/z* na $R_t=6,49$ min, dok je DNL evidentiran na $R_t=6,19$ min, a *eDLA2* na $R_t=4,47$ min (**Slika 43 h**). U ekstraktima *N. nervosa* identifikovani su *trans,cis*-NL na osnovu $[M+H]^+$ 167 *m/z* na $R_t=6,78$ min, DNL sa pseudomolekularnim jonom $[M+H]^+$ 165 *m/z* na $R_t=5,5$ min, kao i *eDLA2* sa $[M+H]^+$ 359 *m/z* na $R_t=4,47$ min (**Slika 43 i**). Fragmentacioni profili svih identifikovanih jedinjenja prikazani su na **Slici 43 g, 43 h, 43 i**. U metanolnom ekstraktu listova *N. nervosa* nije bilo moguće kvantifikovati *trans,cis*-NL, DNL i *eDLA2*, jer su njihove količine bile ispod granice kvantifikacije (*LOQ*) korišćene analitičke metode.

Svi kvantifikovani iridoidi dominantno se proizvode u listovima *N. rtanjensis* (**Slika 43 d**) i *N. sibirica* (**Slika 43 e**), u odnosu na druge organe ovih vrsta. U listovima *N. rtanjensis* preovlađuje *trans,cis*-NL, dok je u listovima *N. sibirica* *cis,trans*-NL stereoizomer dominantno prisutan. Sadržaj *trans,cis*-NL u listovima *N. rtanjensis* je oko 80 puta viši nego u korenu ove vrste. Koncentracija *cis,trans*-NL u korenu *N. sibirica* je niža približno 30 puta u odnosu na sadržaj ovog jedinjenja u listovima. Detektovani iridoidi u organima *N. nervosa* prisutni su samo u tragovima (**Slika 43 f**).

Za svaku od genskih sekvenci koje kodiraju za iridoid sintazu *NrIS2*, *NsIS* i *NnIS*, dizajnirani su specifični prajmeri za *PCR* u realnom vremenu. Analizirani su nivoi ekspresije gena *NrIS2*, *NsIS* i *NnIS* u korenu, stablu i listovima vrsta iz kojih su ovi geni izolovani (redom – *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*). Apsolutna kvantifikacija ekspresije *NrIS2* pokazuje da se ovaj gen značajno više eksprimira u listovima (približno 1000 puta) i stablu *N. rtanjensis*, nego u korenu (**Slika 43 a**). Sličan obrazac zapaža se i u sadržaju iridoida u organima ove vrste. Takođe, ovaj obrazac se uočava i kod ekspresije *NsIS* u *N. sibirica* (**Slika 43 b**), kao i u sadržaju *cis,trans*-NL u organima ove vrste. U listovima se *NsIS* eksprimira približno 20 000 puta više nego u korenu. Nivoi ekspresije *NnIS* najviši su u stablu, a najniži u korenu ove vrste (**Slika 43 c**). Broj kopija transkripata ovog gena u listovima *N. nervosa* je veoma visok i iznosi oko 70000 na 50 ng RNK, dok je broj transkripata *NrIS2* u listovima *N. rtanjensis* približno 30000 na 50 ng RNK, a *NsIS* u listovima *N. sibirica* oko 50 000 na 50 ng RNK. Nivoi transkripata u listovima su 30, a u stablu 70 puta veći nego u korenu *N. nervosa*. Razlog za ovaj nizak odnos je povišen broj kopija transkripata gena za iridoid sintazu u korenu *N. nervosa*, koji je približno 2000 puta viši u odnosu na koren *N. rtanjensis* i *N. sibirica*. Ovo može biti posledica kontaminacije uzoraka korena tkivima stabla prilikom uzorkovanja biljnog materijala za analize.



Slika 43. Kvantifikacija dominantnih iridoida i ekspresija *IS* u korenu, stablu i listovima tri vrste *Nepeta*. Apsolutna kvantifikacija genske ekspresije *NrIS2* u organima *N. rtanjensis* (a), *NsIS* u *N. sibirica* (b) i *NnIS* u organima *N. nervosa* (c). Na slici je prikazan sadržaj dominantnih iridoida u korenu, stablu i listu *N. rtanjensis* (DNL, *trans,cis*-NL i eDLA1 – 4,47 min) (d), *N. sibirica* (DNL, *cis,trans*-NL i eDLA2 – 4,47min) (e) i *N. nervosa* (DNL, *trans,cis*-NL – 6,78 min i eDLA2 – 4,47 min) (f). Prikazani su UHPLC-SRM hromatogrami i maseni spektri detektovanih iridoida u *N. rtanjensis* (g), *N. sibirica* (h) i *N. nervosa* (i). Rezultati su prikazani u vidu srednjih vrednosti tri biološka ponavljanja ± srednja greška. Na svim histogramima vrednosti obeležene različitim slovima se značajno razlikuju ($p \leq 0,01$) prema *post hoc* Tukey testu *One-way ANOVA*.

4.4. Ispitivanje bioloških aktivnosti metanolnih ekstrakata i dominantnih iridoidnih i fenolnih jedinjenja listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*

U okviru doktorske disertacije ispitana je biološka aktivnost metanolnih ekstrakata dve vrste roda *Nepeta*, kao i njihovih glavnih komponenti. Cilj ovih istraživanja jeste pružanje novih dokaza koji idu u prilog teoriji da stereohemija nepetalaktona u značajnoj meri determiniše biološku aktivnost vrsta roda *Nepeta*.

4.4.1. Metaboličko profilisanje iridoida i fenola u metanolnim ekstraktima listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*

Rezultati metaboličkog profilisanja iridoida izdvajaju epideoksiloganinsku kiselinu kao dominantno iridoidno jedinjenje u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* (Tabela 4). Ovaj iridoidni glukozid je u ekstraktima zastupljeniji od iridoidnih aglikona nepetalaktona i dehidronepetalaktona. Ispitivane vrste se razlikuju u pogledu stereohemije NL, kod *N. rtanjensis* dominantna forma je *trans,cis*-NL, dok je kod *N. argolica* subsp. *argolica* prisutan *cis,trans*-NL: Količina DNL u ekstraktima *N. rtanjensis* je približno 3 puta viša od količine *trans,cis*-NL. Vrsta *N. argolica* subsp. *argolica* odlikuje se značajno višim količinama *cis,trans*-NL od DNL (Tabela 4).

Tabela 4. Sadržaj dominantnih iridoida u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* analiziranih u SRM eksperimentu UHPLC/(±)HESI-MS² uređaja. Vrednosti sadržaja iridoida su izražene u jedinicama µg/100 mg SE, i predstavljene kao srednje vrednosti±sd.

		UHPLC/MS ² podaci			Sadržaj (µg/100 mg SE) mean±sd	
Br.	Jedinjenje	Rt (min)	[M+CHOOH-H] ⁻ (m/z)	MS ² fragmenti (m/z)	<i>N. rtanjensis</i>	<i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i>
1	Epideoksiloganinska kiselina ^S	3,30	405	359; 197	3288,449±120,280	3152,206±54,675
		Rt (min)	[M+H] ⁺ m/z	MS ² fragmenti		
2	Dehidronepetalakton ^S	5,51	165	149; 77	1397,811±27,139	29,968±3,568
3	<i>Cis,trans</i> - nepetalakton ^S	6,49	167	111; 77	/	2489,277±62,169
4	<i>Trans,cis</i> - nepetalakton ^S	6,69	167	111; 77	463,350±8,437	/

^S Jedinjenja identifikovana pomoću standarda
Skraćenice: SE– suvi metanolni ekstrakt

Tabela 5. Sadržaj kinične kiseline i dominantnih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* analiziranih u SRM eksperimentu UHPLC/(–)HESI-MS² uređaja. Vrednosti sadržaja iridoida su izražene u jedinicama µg/100 mg SE, i predstavljene kao srednje vrednosti±sd.

		UHPLC/MS ² podaci			Sadržaj (µg/100 mg SE) mean±sd	
Br.	Jedinjenje	Rt (min)	[M–H] ⁻ (m/z)	MS ² fragmenti (m/z)	<i>N. rtanjensis</i>	<i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i>
1	Kinična kiselina ^S	0,92	191	171	37,500±2,234	37,033±2,775
2	Hlorogena kiselina ^S	5,18	353	191	883,500±7,374	1116,433±1,595
3	Kafeična kiselina ^S	5,58	179	134, 135	2,033±0,231	3,100±0,265
4	Kvercetin 3- <i>O</i> rutinozid (Rutin) ^S	6,19	609	300, 301	2,500±0,100	4,067±0,404
5	Kvercetin 3- <i>O</i> glukozid (Izokvercetin) ^S	6,44	463	271, 300	1,600±0,100	2,700±0,001
6	Kempferol 3- <i>O</i> glukozid (Astragalina) ^S	6,84	447	294, 285	2,967±0,058	3,067±0,058
7	Ruzmarinska kiselina ^S	7,16	359	133, 161	388,033±3,225	301,800±3,747

^S Jedinjenja identifikovana pomoću standarda
Skraćenice: SE- suvi metanolni ekstrakt

Analiza sadržaja fenola ukazala je na prisustvo značajnih količina fenolnih kiselina i flavonoida u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* (Tabela 5). Ruzmarinska i hlorogena kiselina su najzastupljenija jedinjenja iz grupe fenolnih kiselina. Dominantno fenolno jedinjenje je hlorogena kiselina u ekstraktima obe vrste. Pri tome, u ekstraktu *N. argolica* subsp. *argolica* koncentracija hlorogene kiseline je približno 4 puta viša, a u ekstraktu *N. rtanjensis* približno 2 puta viša od koncentracije ruzmarinske kiseline. U tragovima su detektovane i kinična i kafeična kiselina, kao i rutin, izokvercetin i astragalin (Tabela 5).

4.4.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata i dominantnih iridoidnih i fenolnih jedinjenja listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*

Primenom mikrodilucione metode ispitano je antimikrobno dejstvo metanolnih ekstrakata listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*, kao i izolovanih *cis,trans*-NL, *trans,cis*-NL, DNL, epideoksiloganinske kiseline (*eDLA*) i ruzmarinske kiseline (*RA*). Cilj ovih istraživanja bio je određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (*MIC*) ekstrakata, tj. koncentracije koja inhibira rast mikroorganizama. Određena je takođe minimalna baktericidna (*MBC*) i minimalna fungicidna koncentracija (*MFC*), koje predstavljaju koncentracije ekstrakata na kojima nije došlo do rasta mikroba. Referentnu antibakterijsku aktivnost predstavljao je antibiotik streptomycin, dok je antifungalna aktivnost upoređena sa komercijalnim fungicidom ketokonazolom. Rezultati antimikrobne aktivnosti prikazani su u Tabeli 6.

Metanolni ekstrakti listova dve vrste roda *Nepeta* pokazuju značajnu antibakterijsku aktivnost prema svim ispitanim sojevima. U zavisnosti od bakterijske vrste, vrednosti *MIC* ekstrakta *N. rtanjensis* kretale su se u opsegu 0,1–0,4 µg/ml, a za ekstrakte *N. argolica* subsp. *argolica* 0,15–0,3 µg/ml. *MBC* vrednosti ekstrakata *N. rtanjensis* bile su 0,2–0,6 µg/ml, dok su baktericidne koncentracije *N. argolica* subsp. *argolica* iznosile 0,2–0,4 µg/ml. Najjače antibakterijsko dejstvo ekstrakt listova *N. rtanjensis* pokazao je na sojevima bakterija *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *L. monocytogenes*, dok je antibakterijsko dejstvo ekstrakta *N. argolica* subsp. *argolica* bilo najizraženije u slučaju *E.coli*. Sva ispitana čista jedinjenja iridoida, kao i *RA* pokazivala su značajno jaču antibakterijsku aktivnost na sve ispitane sojeve od streptomicina. *MIC* vrednosti *cis,trans*-NL iznosile su 0,0025–0,04 µg/ml, *trans,cis*-NL 0,01–0,08 µg/ml, *eDLA* 0,005–0,06 µg/ml, a *RA* 0,0075–0,04 µg/ml. U odnosu na sva ispitana jedinjenja, najefikasnije antibakterijsko dejstvo pokazao je *cis,trans*-NL na *L. monocytogenes* i *S. typhimurium*.

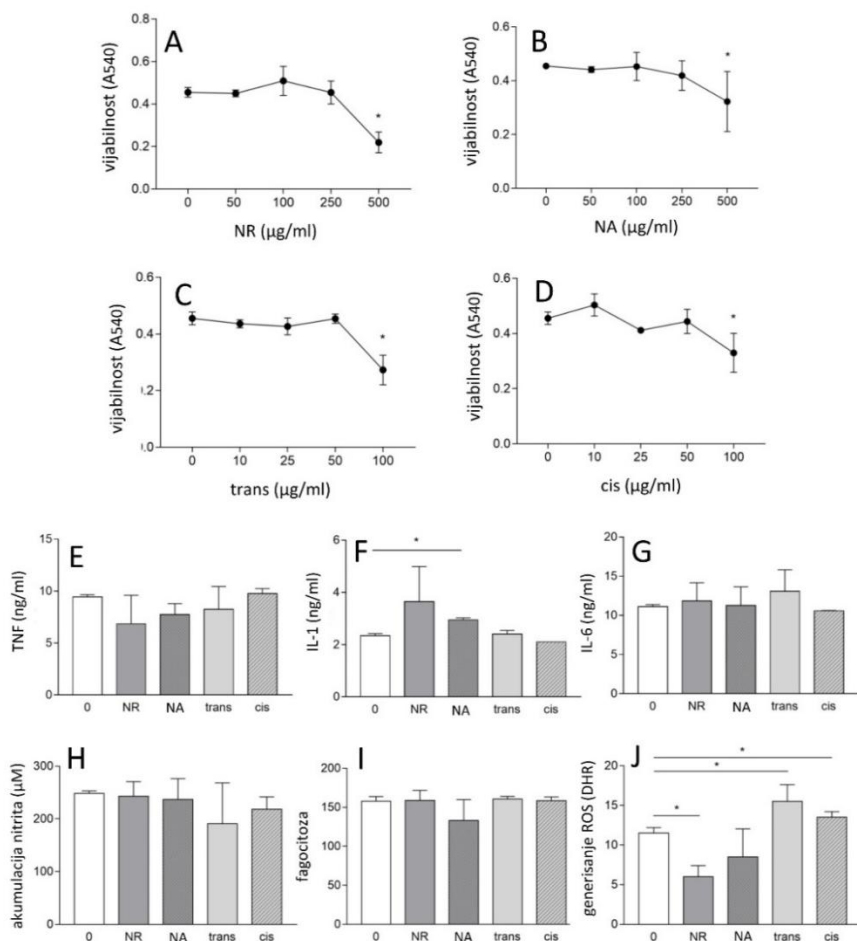
Ekstrakti listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* prikazali su nešto slabije antifungalno dejstvo na sve ispitane vrste gljiva u poređenju sa komercijalnim fungicidom ketokonazolom. Izuzetak je vrsta *P. ochlochloron*, na čiji su rast i preživljavnje ekstrakti listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* imali do pet puta jače dejstvo u odnosu na ketokonazol. Vrednosti *MIC* ekstrakta *N. rtanjensis* kretale su se u opsegu 0,05–0,3 µg/ml, a u slučaju *N. argolica* subsp. *argolica* 0,1–0,3 µg/ml. *MFC* vrednosti ekstrakata listova se nisu značajno razlikovale i iznosile su 0,05–0,4 µg/ml. Najjače antifungalno dejstvo ekstrakta listova *N. rtanjensis* uočeno je kod *A. niger*, koje je bilo pet puta jače u odnosu na ketokonazol. Čista jedinjenja prikazivala su značajno jaču antifungalnu aktivnost na sve ispitane sojeve u odnosu na ekstrakte i ketokonazol, pri čemu su *MFC* vrednosti bile između 6 i 150 puta niže nego kod komercijalnog fungicida. U poređenju sa efektima analiziranih jedinjenja na sve ispitane vrste gljiva, najjače antifungalno dejstvo pokazao je *trans,cis*-NL u slučaju *A. ochraceus*, pri čemu je fungicidno dejstvo ovog jedinjenja bilo 40 puta jače u odnosu na ketokonazol.

Tabela 6. Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata listova *N. rtanjensis*, *N. argolica* subsp. *argolica*, kao i standarda *cis,trans*-NL, *trans,cis*-NL, DNL, *eDLA* i RA. Prikazane su minimalne inhibitorne (*MIC*) i letalne koncentracije (*MBC* – baktericidna, *MFC* – fungicidna).

Antibakterijsko dejstvo	<i>N. rtanjensis</i>	<i>N. argolica</i>	<i>cis,trans</i> -NL	<i>trans,cis</i> -NL	RA	<i>eDLA</i>	<i>Streptomicin</i>	
	<i>MIC-MBC</i>	<i>MIC-MBC</i>	<i>MIC-MBC</i>	<i>MIC-MBC</i>	<i>MIC-MBC</i>	<i>MIC-MBC</i>	<i>MIC-MBC</i>	
	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	
<i>B. cereus</i>	0,2-0,4	0,2-0,4	0,04-0,08	0,08-0,12	0,01-0,02	0,06-0,08	0,1-0,2	
<i>S. aureus</i>	0,15-0,2	0,2-0,4	0,01-0,02	0,01-0,04	0,0075-0,01	0,005-0,01	0,05-0,1	
<i>M. flavus</i>	0,2-0,4	0,15-0,4	0,03-0,04	0,03-0,04	0,03-0,04	0,6-0,8	0,1-0,2	
<i>L. monocytogenes</i>	0,15-0,2	0,2-0,4	0,0025-0,005	0,01-0,02	0,015-0,02	0,02-0,04	0,2-0,3	
<i>E. faecalis</i>	0,4-0,6	0,3-0,4	0,015-0,04	0,04-0,08	0,04-0,08	0,03-0,04	0,1-0,2	
<i>P. aeruginosa</i>	0,1-0,2	0,3-0,4	0,01-0,02	0,03-0,04	0,01-0,02	0,04-0,06	0,2-0,3	
<i>E. coli</i>	0,2-0,4	0,15-0,2	0,02-0,04	0,02-0,04	0,03-0,04	0,02-0,04	0,1-0,2	
<i>S. typhimurium</i>	0,2-0,4	0,2-0,4	0,0025-0,005	0,04-0,08	0,03-0,04	0,005-0,01	0,2-0,3	
Antifungalno dejstvo	<i>N. rtanjensis</i>	<i>N. argolica</i>	<i>cis,trans</i> -NL	<i>trans,cis</i> -NL	RA	<i>eDLA</i>	DNL	<i>Ketokonazol</i>
	<i>MIC-MFC</i>	<i>MIC-MFC</i>	<i>MIC-MFC</i>	<i>MIC-MFC</i>	<i>MIC-MFC</i>	<i>MIC-MFC</i>	<i>MIC-MFC</i>	<i>MIC-MFC</i>
	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]
<i>A. fumigatus</i>	0,1-0,2	0,1-0,2	0,01-0,02	0,01-0,02	0,02-0,04	0,04-0,06	0,02-0,04	0,25-0,5
<i>A. ochraceus</i>	0,1-0,2	0,1-0,2	0,005-0,02	0,0025-0,005	0,005-0,01	0,01-0,02	0,005-0,01	0,15-0,2
<i>A. versicolor</i>	0,1-0,2	0,1-0,4	0,02-0,03	0,005-0,01	0,01-0,02	0,04-0,06	0,02-0,04	0,2-0,5
<i>A. niger</i>	0,05-0,1	0,1-0,4	0,005-0,02	0,005-0,002	0,0075-0,01	0,015-0,04	0,01-0,02	0,2-0,5
<i>A. fuciculosum</i>	0,2-0,4	0,2-0,4	0,02-0,03	0,005-0,01	0,005-0,01	0,005-0,04	0,02-0,03	0,2-0,5
<i>P. ochlochloron</i>	0,2-0,4	0,3-0,4	0,005-0,01	0,005-0,01	0,01-0,02	0,06-0,08	0,03-0,06	1-1,5
<i>P. v. Cylopium</i>	0,3-0,4	0,3-0,4	0,01-0,03	0,01-0,02	0,01-0,02	0,06-0,08	0,03-0,06	0,2-0,5

4.4.3. Imunomodulacijski uticaj metanolnih ekstrakata listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* i izolovanih dominantnih nepetalaktona na makrofage *in vitro*

Peritonealni makrofagi iz zdravih DA pacova dobijeni su lavažom peritonealne šupljine. Zatim su makrofagi stimulisani lipopolisaharidom (LPS) i tretirani različitim koncentracijama metanolnih ekstrakata listova *N. rtanjensis* (NR) i *N. argolica* subsp. *argolica* (NA), kao i *trans,cis*-NL i *cis,trans*-NL (Slika 30). Posle 24h tretmana vijabilnost ćelija je analizirana testom CV. Aktivacioni status ćelija određen je merenjem produkcije proinflamacijskih citokina *IL-1 β* , *IL-6* i *TNF* testom *ELISA*, kao i merenjem produkcije nitrita, reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i nivoa fagocitoze. Rezultati su pokazali da preživljavanje ćelija smanjuju koncentracije ekstrakata listova *N. rtanjensis* (Slika 44 A) i *N. argolica* subsp. *argolica* (Slika 44 B) od 500 $\mu\text{g/ml}$, kao i koncentracije *trans,cis*-NL (Slika 44 C) i *cis,trans*-NL (Slika 44 D) od 100 $\mu\text{g/ml}$, dok niže koncentracije nisu imale efekata na vijabilitet. Zbog toga, niže koncentracije ekstrakata listova dve vrste roda *Nepeta* od 250 $\mu\text{g/ml}$ i 50 $\mu\text{g/ml}$ izolovanih nepetalaktona korišćene su u eksperimentima sa makrofagima *in vitro*.



Slika 44. Imunomodulacijski efekat ekstrakata listova *N. rtanjensis* (NR) i *N. argolica* subsp. *argolica* (NA), kao i *trans,cis*-NL i *cis,trans*-NL na makrofage. Makrofagi su stimulisani pomoću LPS, a zatim su tretirani različitim koncentracijama ekstrakata listova dve vrste *Nepeta* i nepetalaktona tokom 24h. Zatim je proverena vijabilnost ćelija CV testom (A, B, C, D), dok je produkcija citokina (E, F, G) i nitrita (H) merena u supernatantima kultura. Nivoi fagocitoze (I) i ROS (J) određeni su pomoću protočne citometrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD ponovljenih eksperimenata. * $p < 0,05$ je statistički značajna razlika. Skraćenice: NR – metanolni ekstrakt *N. rtanjensis*, NA – metanolni ekstrakt *N. argolica* subsp. *argolica*, trans – *trans,cis*-nepetalakton, cis – *cis,trans*-nepetalakton.

Rezultati metode po Grisu pokazali su da ove koncentracije ekstrakata listova *Nepeta* i čistih nepetalaktona nemaju uticaja na proizvodnju nitrita od strane aktiviranih makrofaga (**Slika 44 H**). Takođe, rezultati *ELISA* testa prikazali su da korišćene koncentracije ekstrakta listova *N.rtanjensis*, *N. argolica* subsp. *argolica*, *trans,cis*-NL i *cis,trans*-NL nemaju značajnog efekta na produkciju citokina *TNF* (**Slika 44 E**), kao ni na *IL-6* (**Slika 44 G**), dok se povećanje *IL-1 β* javlja samo u slučaju ekstrakta *N. rtanjensis* u odnosu na netretiranu kontrolu (**Slika 44 F**). Nivo fagocitoze po ćeliji makrofaga ostaje nepromenjen nakon tretmana sa analiziranim ekstraktima i nepetalaktonima (**Slika 44 I**). Produkcija *ROS* po ćeliji je značajno smanjena nakon tretmana ekstraktom lista *N. rtanjensis*, dok ista koncentracija ekstrakta *N. argolica* subsp. *argolica* nema efekata. S druge strane, tretman sa 50 $\mu\text{g/ml}$ *trans,cis*-NL i *cis,trans*-NL izaziva povećanje proizvodnje *ROS* u makrofagima.

5. Diskusija

Iako je poslednjih decenija izgledalo da će razvoj kombinatorijalne hemije ubrzati proces selekcije i sinteze novih i efikasnijih bioaktivnih jedinjenja kroz ekonomičniji pristup, poslednje faze kliničkih ispitivanja je prošao samo mali broj sintetičkih jedinjenja (*Ashton i Moloney, 2007*). Ogromne su prednosti kombinatorijalne hemije u industriji lekova, prvenstveno u stvaranju velike biblioteke malih molekula za kratko vreme. Osim toga, kombinatorijalna hemija omogućava produkciju onih jedinjenja koja se u prirodnim sistemima ne mogu sintetisati. Pretpostavka je da će se pun potencijal ovog ogranka farmaceutске industrije tek razviti u narednim decenijama (*Liu i sar., 2017*). S druge strane, prirodna jedinjenja imaju strukturnu kompleksnost i fitohemijske karakteristike koje su evoluirale kroz složene interakcije sa biološkim sistemima, zbog čega su i dalje u prednosti u otkrivanju novih lekova. Primera radi, od ukupnog broja biofarmaceutika koji prođu prvu fazu kliničkih ispitivanja, 25% dobije konačno regulatorno odobrenje, dok taj uspeh dostiže svega 6% sintetičkih jedinjenja (*Chemler i Koffas, 2008*).

Potencijalni biofarmaceutik i dominantno jedinjenje etarskih ulja vrsta roda *Nepeta* – nepetalakton, pokazuje brojne biološke aktivnosti, uključujući antimikrobno, antiinflamacijsko, sedativno, fitotoksično, citostatičko i repelentno prema insektima (*Dmitrović i sar., 2015; Gkinis i sar., 2003; Hardie i sar., 1997; Miceli i sar., 2005; Nestorović i sar., 2010; Peterson i sar., 2002; Sakurai i sar., 2016; Skorić i sar., 2017*). U biljnom carstvu je ovo iridoidno jedinjenje zastupljeno samo u vrstama roda *Nepeta* u obliku četiri stereoizomera, koji imaju različita bioaktivna svojstva (*Mišić i sar., 2015; Nestorović i sar., 2010*). Rasvetljavanje biosintetskog puta nepetalaktona na molekularnom nivou je od ključnog značaja za uspostavljanje masovne produkcije ovog jedinjenja pomoću metaboličkog inženjeringa i sintetičke biologije. Mnoga jedinjenja se, zahvaljujući sintetičkoj biologiji, proizvode komercijalno u dobro okarakterisanim model sistemima – kvascima i bakteriji *Escherichia coli*. Nedavno je uspešno uspostavljen sistem na bazi fermentacije za produkciju *cis,trans*-nepetalaktola u vrsti *Saccharomyces cerevisiae* (*Billingsley i sar., 2017*), a nakon što je istom sistemu pridodat i gen za NEPS1 iz *N. mussini* (*Lichman i sar., 2019*), ova platforma je optimizovana i za produkciju visokih koncentracija *cis,trans*-nepetalaktona od čak 153 mg/l (*Billingsley i sar., 2019*). Proizvodnja biofarmaceutika u heterologim domaćinima je posebno značajna kada se ova jedinjenja prirodno sintetišu u biljkama koje je teško kultivisati, ili kada se u biljnim tkivima akumuliraju niske koncentracije ovih jedinjenja, kao što je paklitaksol u *Taxus* spp. ili vinblastin i vinkristin u *C. roseus* (*Malik i sar., 2011; Miettinen i sar., 2014*). Međutim, kod mnogih vrsta biljaka su dominantni specijalizovani metaboliti zastupljeni u visokim koncentracijama, kao što je mentol u *M. piperita*, artemizinin u *A. annua*, sklareol u *Salvia sclarea*, kaučuk u *Hevea brasiliensis* (*Tissier, 2018*). Proizvodnja ovih jedinjenja u heterologim domaćinima može višestruko prevazilaziti troškove gajenja autologih biljaka domaćina i procesa ekstrakcije jedinjenja iz biljnih tkiva (*Peplow, 2016*).

Mnoge vrste roda *Nepeta* su veoma bogate nepetalaktonom, kao što je *N. rтанјensis* u kojoj se dominantno sintetiše *trans,cis*-nepetalakton ili *N. argolica* subsp. *argolica* sa visokim koncentracijama *cis,trans*-nepetalaktona (*Mišić i sar., 2015*). Ove vrste pripadaju sekciji Pycnonepeta Benth., koju čine endemiti Balkanskog poluostrva, dok su neke vrste i kritično ugrožene. Rтанјska metvica (*N. rтанјensis*) je retka i ugrožena biljna vrsta koja nastanjuje južne padine planine Rтанј u jugoistočnoj Srbiji. Mala prirodna populacija ove vrste sadrži svega nekoliko stotina jedinki. Veličina populacije se neprekidno smanjuje usled slabe klijavosti semena i negativnog antropogenog uticaja, što može dovesti do nepovratnog gubitka genetičkog diverziteta ove vrste. Kultivacija *N. rтанјensis* u strogo kontrolisanim uslovima sredine mogla bi da smanji pritisak na prirodne populacije, kao i da omogući manipulisanje postojećim fenotipskim varijabilnostima u pogledu sadržaja i prinosa bioaktivnih jedinjenja. Ranija

istraživanja prikazuju da se ova vrsta može uspješno mikropropagirati u uslovima *in vitro* i kultivisati u polju (Mišić i sar., 2005, 2015, Skorić i sar., 2017).

Centar rasprostiranja vrsta iz porodice Lamiaceae i roda *Nepeta* je Mediteranski basen, pa su ove biljke adaptirane na kserotermna staništa, mada u okviru roda ima i vrsta koje nastanjuju manje ekstremna staništa. Pokazano je da se kod nekih vrsta ovog roda menja sastav etarskog ulja pod uticajem vodnog deficita (Layeghhaghighi i sar., 2014; Ramezan i Abbaszadeh, 2016; Said-Al Ahl i sar., 2016). Pojedine vrste roda *Nepeta* su postale značajne hortikulture i medicinske biljke semi-aridnih i aridnih predela, zahvaljujući njihovoj adaptiranosti na uslove vodnog deficita i visokoj produkciji etarskih ulja. Neke vrste roda *Nepeta* su introdukovane i gaje se u oblastima sa ekstremnim sredinskim uslovima, kao što je *N. cataria* na zapadnim Himalajima (Stappen i sar., 2015) i u Burundiju (Patience i sar., 2018), dok su *N. kotschyi*, *N. menthoides*, *N. crassifolia*, *N. cataria*, *N. pogonosperma* i *N. binaludensis* kultivisane u aridnim predelima Irana (Hadi i sar., 2017, Ramezan i Abbaszadeh, 2016, Nadjafi i sar., 2012). Takođe, *N. cataria*, *N. cataria* var. *citriodora* i *N. grandiflora* su prepoznate kao medicinske biljke pogodne za kultivaciju u Egiptu (Mohamed i sar., 2018; Said-Al Ahl i sar., 2016).

Poznavanje efekata vodnog deficita na rast, fiziologiju i morfologiju listova, kao i na metabolizam nepetalaktona u vrstama roda *Nepeta*, preduslov je za optimizaciju uslova za gajenje ovih biljaka, i njihovo sakupljanje, kao i za rukovanje biljnim materijalom. Rasvetljavanje biosintetskog puta nepetalaktona na molekularnom nivou, kao i mehanizama koji regulišu metabolizam ovog jedinjenja u listovima vrsta roda *Nepeta* tokom dehidratacije od esencijalnog je značaja za razvoj strategije za masovnu produkciju ovog jedinjenja. Doktorska disertacija po prvi put nudi objašnjenja o molekularnim mehanizmima, koji stoje iza regulacije metabolizma nepetalaktona u uslovima dehidratacije listova. Rezultati ove disertacije praktično utiru put metaboličkom inženjeringu i uspostavljanju platformi za produkciju visokih prinosa nepetalaktona i njegovih derivata u heterologim i autologim domaćinima.

5.1. Biosinteza i akumulacija nepetalaktona na nivou tkiva i razvojnih stadijuma listova *N. rtanjensis*

Brojna biohemijska istraživanja glandularnih trihoma na različitim vrstama ističu da se u glandularnim ćelijama odvijaju intenzivne metaboličke aktivnosti, te da su one glavna mesta biosinteze sekretovanih jedinjenja iz grupe specijalizovanih metabolita (Tissier i sar., 2012). Peltatni glandularni trihomi porodice Lamiaceae su posebno dobro adaptirani da skladište i zadržavaju isparljiva jedinjenja (Ascensão i sar., 1995; Bisio i sar., 1998; Bourett i sar., 1994; Božić i sar., 2015; Bruni i Modenesi, 1983; Huang i sar., 2008; McCaskill i sar., 1992, Turner i sar., 2000; Werker i sar., 1993). Subkutikularni prostor za skladištenje, koji nastaje odvajanjem kutikule od ćelijskog zida, nalazi se iznad glandularnih ćelija. Nakon pucanja kutikule, isparljiva jedinjenja se oslobađaju iz subkutikularnog prostora. Površinu listova *N. rtanjensis* gusto pokrivaju mehaničke i žlezdane dlake. Među žlezdanim izdvajaju se kapitatne sa jednoćelijskim ili dvoćelijskim glavama, kao i peltatne dlake, koje se sastoje od četvoroćelijske sekretorne glave (Husain i sar., 1989; Ljaljević-Grbić 2006; Bošnjak-Neumüller i sar., 2018).

Ranije fitohemijske studije vrsta roda *Nepeta* ukazale su na veliki diverzitet iridoidnih monoterpenoida, među kojima su nepetalaktol, nepetalakton (NL), dehidronepetalakton (DNL) i epideoksiloganinska kiselina (eDLA) prilično rasprostranjeni (Formisano i sar., 2011). Kada je u pitanju vrsta *N. rtanjensis*, do sada je evidentirano da ona proizvodi samo dva streoizomera NL (*trans,cis*-NL i *cis,trans*-NL), kao i DNL. Nekoliko publikacija je navelo da *LC-MS* i *GC-MS* analize izdvajaju *trans,cis*-NL kao glavni iridoidni monoterpenoid etarskog ulja i metanolnog ekstrakta *N. rtanjensis* (Chalchat i sar., 1998, Dmitrović i sar., 2015, Ljaljević Grbić i sar., 2008, Mišić i sar., 2015, Nestorović i sar., 2010, Stojanović i sar., 2005). S druge strane, DNL je identifikovan u većim količinama u metanolnom ekstraktu *N. rtanjensis* (Mišić i sar., 2015), dok u etarskom ulju ove vrste nije evidentiran, što ukazuje

na to da su procedure pripreme uzoraka i ekstrakcije od ključne važnosti za adekvatno metaboličko profilisanje. U predstavljenim rezultatima su metanolni ekstrakti listova *N. rtanjensis* analizirani pomoću *UHPLC–LTQ/Orbitrap/MS* u pozitivnom jonizacionom modu, kako bi se identifikovali iridoidi biosintetskog puta NL. Rezultati su potvrdili prisustvo *trans,cis*-NL i DNL, dok nepetalaktol nije evidentiran u ekstraktima listova *N. rtanjensis*. Pretpostavlja se da je količina nepetalaktola u uzorcima niža od nivoa kvantifikacije korišćene analitičke metode (LOQ, eng. *limit of quantification*), te da se ono efikasno konvertuje do finalnog jedinjenja biosintetskog puta – nepetalaktona.

Kvalitativna *GC-MS* analiza metanolnih ekstrakata listova *N. rtanjensis* izdvojila je *trans,cis*-NL kao dominantan pik. Pored ovog jedinjenja, iz grupe terpenoida identifikovani su i DNL, α -kopaen, limonen oksid, germakren D i γ -kadinen, što je u skladu sa literaturnim podacima za etarsko ulje ove vrste (*Chalchat* i sar., 2000, *Ljaljević Grbić* i sar., 2008).

Uporedna analiza nivoa ekspresije *NrIS1* i sadržaja *trans,cis*-NL i DNL u pet različitih stadijuma razvića listova *N. rtanjensis* ukazala je na promene u biosintezi i akumulaciji NL do kojih dolazi tokom procesa razvića listova. Sadržaj *trans,cis*-NL i DNL je najviši u najmlađim listovima, i značajno opada tokom razvića listova. Veoma sličan trend pokazuju i nivoi transkripata *NrIS1* u pet razvojnih stadijuma listova *N. rtanjensis*, kao i zbirna količina *trans,cis*-NL i DNL. Odnos koncentracija DNL/*trans,cis*-NL ima značajno više vrednosti u najmlađim, u poređenju sa starijim fazama razvića listova, što snažno implicira da je biosinteza NL tokom razvića listova regulisana na nivou genske ekspresije. Izoforma *NrIS1* nije uspešno funkcionalno okarakterisana u esejima *in vitro* izvedenim u ovoj disertaciji, a filogenetska analiza je svrstava u manje aktivnu familiju 1 IS iz *Nepeta*. Međutim, rezultati ukazuju da ova izoforma IS verovatno ima ulogu u metabolizmu NL u određenim fazama razvića listova *N. rtanjensis*.

Akumulacija određenog metabolita u biljkama zavisi od balansa između stope njegove biosinteze i stope gubitka. Stopa gubitka jednog jedinjenja je posledica njegovog direktnog oslobađanja u atmosferu i/ili procesa katabolizma. Pri tome, kod veoma isparljivih jedinjenja, kao što su monoterpenoidi, emisija u atmosferu je glavni mehanizam, koji dovodi do njegovog gubitka iz biljnih tkiva. Pomoću *head-space GC/MS* i *PTR-MS* merenja isparljivih jedinjenja u atmosferi koja okružuje biljku, potvrđeno je da se NL intenzivno otpušta sa površine listova *N. rtanjensis* (*Nestorović Živković*, 2013). Međutim, kada je u pitanju ovo istraživanje, svi analizirani listovi su istovremeno sakupljeni sa biljaka, pa se može pretpostaviti da prikazane razlike u sadržaju NL i DNL, u listovima različitih razvojnih stadijuma, nisu zavisile od stope isparavanja ovih jedinjenja. Iako dosadašnje publikacije nisu opisale moguće procese metabolisanja NL u listovima roda *Nepeta*, može se pretpostaviti da je DNL prvi proizvod u procesu katabolizma NL. U literaturi je poznato da je DNL rezultat oksidacije NL ili dehidrogenizacije (*Bicchi* i sar., 1984; *De Pooter* i sar., 1988; *Reverchon* i *Rubilli*, 1997). Ovo jedinjenje je ranije evidentirano u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis* (*Mišić et al.*, 2015). Takođe, DNL je zastupljen u većim količinama (69%) u etarskom ulju *N. tuberosa* subsp. *tuberosa* (*Cotrim* i sar., 1994), dok je njegov sadržaj u etarskim uljima *N. cataria*, *N. nepetella*, *N. amethystina*, *N. grandiflora*, *N. nuda* i *N. teydea* (*Bicchi* i sar., 1984; *Handjieva* i sar., 1996; *Velasco-Negueruela* i sar., 1996) niži od 1%. Efikasnost degradacije NL procenjena je kroz izračunavanje odnosa DNL/NL u pet različitih razvojnih stadijuma razvića listova *N. rtanjensis*. Rezultati ističu da su promene u akumulaciji NL tokom razvića listova praćene izmenama u sastavu DNL. Naime, odnos DNL/NL je značajno viši u najmlađim listovima, zbog visoke koncentracije DNL. Može se pretpostaviti da je konverzija *trans,cis*-NL do DNL najintenzivnija u najmlađim listovima. Stoga, smatra se da su obrasci akumulacije NL rezultat stope biosinteze, ali i njegovog metabolisanja i/ili oslobađanja u okolnu atmosferu. Drugi faktor koji može direktno uticati na koncentracije NL i DNL u listovima je vremenski okvir ontogenije glandularnih trihoma i promene njihovih biosintetskih kapaciteta tokom razvića listova, što je prethodno objašnjeno kod *M. piperita* (*Gershenzon* i sar., 1989).

Trihomi su sa površine listova *N. rtanjensis* izdvojeni abrazijom suvim ledom i mehaničkim uklanjanjem sintetičkom četkicom. Ova tehnika je uspešno korišćena za izolaciju trihoma sa površine listova različitih vrsta porodice Lamiaceae (Božić i sar., 2015, Brückner i sar., 2014; Hallahan i sar., 1998, Scheler i sar., 2016; Yerger i sar., 1992). UHPLC/(+)HESI-MS² analiza je potvrdila da se u izolatu trihoma nalazi značajno više *trans,cis*-NL i DNL, u odnosu na tkiva listova nakon odvajanja trihoma, što ukazuje na to da se nepetalaktoni akumuliraju u trihomima. Pretpostavka je da bi razlika u sadržaju ova dva jedinjenja mogla biti i veća, ali da su dobijeni rezultati posledica ograničenja tehnike abrazije suvim ledom. Naime, sama tehnika uklanjanja trihoma nije bila potpuno uspešna, na šta ukazuju zaostali PGT uočljivi na mikrofografijama površine listova nakon abrazije. Takođe, moguće je da je prilikom procesa abrazije došlo do mehaničkog oštećenja trihoma, tako da su iz njih oslobođeni NL i DNL, koji su zaostali na površini listova bez trihoma.

Kako bi se upotpunili dobijeni rezultati i prevazišli eksperimentalni nedostaci UHPLC/*qqq*MS analize upotrebljena je Ramanova spektroskopija, koja je za cilj imala da utvrdi hemijski sadržaj različitih tipova trihoma. Ovom nedestruktivnom metodom analizirani su spektralni regioni 100-1800 cm⁻¹ kapitatnih, peltatnih i mehaničkih trihoma listova *N. rtanjensis*. Kao standardi su korišćeni čisto jedinjenje *cis,trans*-nepetalaktola i etarsko ulje *N. rtanjensis*. Ranije GC-MS i GC-FID analize etarskog ulja *N. rtanjensis* izdvojile su nepetalaktone kao dominantna jedinjenja, sa približno 72% *trans,cis*-NL i 16% *cis,trans*-NL (Dmitrović i sar., 2015). Manje zastupljena terpenska jedinjenja u etarskom ulju su α - i β -pinen, 1,8-cineol, α -kamfolenal, α -kopaen, γ -kopaen, δ -kadinen, α -kalakoren i α -kadinol. Zbog visokog sadržaja nepetalaktona (oko 88%) u etarskom ulju *N. rtanjensis*, Raman spektar prikazuje profil karakterističan za ovo jedinjenje. Takođe, uočena je značajna sličnost Raman spektara etarskog ulja *N. rtanjensis* i čistog nepetalaktola, koji je direktni prekursor NL. Takođe, identitet NL u etarskom ulju potvrđuju karakteristični pikovi, koji odgovaraju sistemu petočlanog laktonskog prstena, kao i oni koji prikazuju vibracije iridoida (Yohannan Panicker i sar., 2006, Schulz i Baranska, 2007). Značajan nivo sličnosti zapaža se kada se uporede Raman spektri etarskog ulja, nepetalaktola i glandularnih trihoma, a naročito peltatnih glandularnih trihoma. Vibracione trake koji odgovaraju signalima supstituisanim aromatičnim prstenovima, kao i oni karakteristični za vibracije cikličnih terpena javljaju se u Raman spektrima referentnih jedinjenja i peltatnih glandularnih trihoma (Lin-Vien i sar., 1991, Schulz i Baranska, 2007). Prema tome, Raman spektroskopska analiza izdvaja peltatne glandularne trihome (PGT) kao glavna mesta akumulacije NL. Ne može se sa sigurnošću odbaciti ni mogućnost akumulacije ovih jedinjenja u kapitatnim glandularnim trihomima. Snažna fluorescencija regiona iznad 1100cm⁻¹ je zamaskirala spektar kapitatnih trihoma, što je prikazano i u ranijim eksperimentima na vrstama *Mentha* (Petry i sar., 2003). Nedostatak pikova karakterističnih za NL u kapitatnim glandularnim trihomima može se objasniti njihovim niskim koncentracijama. Potrebna je detaljnija analiza većeg broja kapitatnih trihoma u kombinaciji sa hemometrijom kako bi se potvrdila ili odbacila ova tvrdnja. Predstavljeni rezultati ističu potencijal Raman spektroskopije kao brzu i sofisticiranu metodu za dobijanje detaljnijih informacija o prostornoj distribuciji metabolita u biljnim tkivima.

Položaj trihoma na površini listova omogućava ekstrakciju sadržaja ovih struktura jednostavnim ispiranjem listova u različitim rastvaračima, a da se pri tom ne ekstrahuju unutrašnji metaboliti listova. Pokazano je da je ovo veoma efikasna, selektivna i brza metoda, jer je ekstrakcija ograničena na jedinjenja na površini listova, a za potpunu ekstrakciju je potrebno nekoliko sekundi do par minuta (Tissier, 2012). Mnoga jedinjenja koja se proizvode u trihomima su hidrofobna, te su u ranijim istraživanjima za efikasnu ekstrakciju metaboličkih sekrecija sa površina listova korišćeni različiti organski rastvarači, kao što su heksan (Oka i sar., 2001; Yenko i sar., 1994), hloroform (Duke i sar., 2014; Majdi i sar., 2011, 2017; Siebert, 2004), dihlorometan (Ambrosio i sar., 2008; Schorr i Da Costa, 2005; Severson i sar., 1984), metanol (Goffreda i sar., 1989; Kakuta i sar., 1992), acetonitril (Keene i Wagner, 1985) ili metil terc-butil etar (Schillmiller i sar., 2009).

Kako bi se dodatno potvrdilo da su trihomi glavno mesto akumulacije NL i DNL u listovima *N. rtanjensis*, listovi *N. rtanjensis* su ekstrahovani u dihlorometanu (*DCM*). Sveži listovi *N. rtanjensis* su uranjani u organski rastvarač *DCM*, nakon čega je uporedo analiziran sadržaj NL i DNL u *DCM* ekstraktima i u listovima nakon uranjanja. Koncentracije NL i DNL rastu u *DCM* ekstraktima uporedo sa produženjem trajanja ekstrakcije, dok se istovremeno sadržaj ovih jedinjenja snižava u listovima nakon *DCM* ekstrakcije. Na SEM mikrografijama površine lista, nakon *DCM* ekstrakcije u trajanju od 40 s, uočljiv je urušen subkutikularni prostor peltatnih glandularnih trihoma, iz kojeg je ispražnjen sadržaj, dok vidnih oštećenja epidermalnih ćelija nema. Ovo potvrđuje da je sadržaj NL i DNL, detektovan u *DCM* ekstraktima, najverovatnije poreklom iz žlezdanih dlaka, a ne iz drugih tkiva listova *N. rtanjensis*. Rezultati dobijeni u ovom eksperimentu idu u prilog hipotezi da su glandularni trihomi glavno mesto akumulacije NL i DNL.

Brojne studije su pokazale da se kod različitih vrsta u glandularnim trihomima odvija biosinteza terpena, kao i njihova akumulacija (*Crocoll i sar., 2010, Olsson i sar., 2009, Ramirez i sar., 2012, Majdi i sar., 2011*), te se moglo pretpostaviti da su upravo ove strukture centri aktivnosti specijalizovanog metabolizma i kod vrsta roda *Nepeta*. U prilog tome idu ranija istraživanja, koja su pokazala da se u peltatnim glandularnim trihomima *N. racemosa* i *N. cataria* akumulira nepetalaktol (*Clark i sar., 1997*), kao i da je nepetalaktol oksidoreduktaza lokalizovana u trihomima listova *N. racemosa* (*Hallahan i sar., 1998*). Kako bi se potvrdilo glavno mesto biosinteze nepetalaktona, analizirana je ekspresija gena kandidata za enzime i odabrane transkripcione faktore (TF), za koje se pretpostavlja da učestvuju u biosintetskom putu NL, u izolatu trihoma (T) i listovima nakon abrazije suvim ledom (AL). Rezultati ekspresije pokazuju da trihomi, koji su izrazito bogati transkriptima biosintetskih gena i TF, predstavljaju centre biosintetske aktivnosti i akumulacije nepetalaktona. Slično rezultatima dobijenim u ovom eksperimentu, kod *T. vulgaris* je pokazano da su u glandularnim trihomima najviši nivoi transkripata gena *DXR, TvTPS1, CYP71D17* i *CYP71D180*, koji učestvuju u biosintezi timola i karvakola (*Majdi i sar., 2017*). U peltatnim glandularnim trihomima listova *M. spicata* dominantno se eksprimira gen koji kodira za TF MsYABBY5 (*Wang i sar., 2016*), sa kojom sekvenca NrYABBY5 pokazuje visok stepen sličnosti (Prilog, **Slika P2.**)

5.2. Metabolizam nepetalaktona u listovima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* tokom dehidratacije izazvane polietilen glikolom (PEG)

Kao sesilni organizmi, biljke su morale da razviju različite mehanizme prilagođavanja dinamičnim promenama u svom okruženju kako bi opstale. Deo adaptivnih strategija jeste i produkcija specijalizovanih metabolita kao svojevrstnih fitohemijskih zaštitnika, a njihov ogroman diverzitet govori o konstantnom evolutivnom pritisku, koji je vodio do hemijskih inovacija (*Chezem i Clay, 2016*). Dok je strukturni diverzitet specijalizovanih metabolita čest i kod bliskih taksona, regulatorni principi cvetnica u odgovoru na određene stresove su veoma funkcionalno konzervirani i evolutivno stariji od mnogih specifičnih biosintetskih puteva (*Wink, 2003*). Brojne publikacije opisuju snažan efekat koji stvara nedostatak vode, izazvan različitim abiotičkim faktorima stresa (npr. suša i osmotski stres) na biosintezu specijalizovanih metabolita (*Charles i sar., 1990; Simon i sar., 1992*). Nedostatak vode pokreće kompleksnu kaskadu odgovora preko signalne transdukcije, metaboličke aktivacije i regulacije genske ekspresije, koji se ispoljavaju kroz ćelijske, fiziološke, kao i promene u procesu razvića biljke (*Bray, 1993*). Akumuliranje *ABA* stimuliše zatvaranje stoma, što je prvi korak u odgovoru na vodni stres, kojim se ograničava razmena gasova. Posledično dolazi do prekomerne produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (*ROS*) i oksidativnog stresa, koji indukuju akumuliranje osmolita i aktiviranje antioksidativnih odbrambenih mehanizama (*Krasensky i Jonak, 2012, Osmolovskaya 2018*). Istovremeno, smanjenje stope fotosinteze snižava asimilaciju ugljenika, pa se njegov fluks od primarnog ka specijalizovanom

metabolizmu ograničava (Ghirardo i sar., 2014). Kako biosinteza terpena zahteva značajnu potrošnju ugljenikovih atoma i energije, što obezbeđuje kroz proces fotosinteze, neophodno je aktivirati tzv. „alternativne izvore ugljenika” kako bi se održala stopa produkcije terpena kod biljaka izloženih stresogenim faktorima (de Souza i sar., 2018). Uskladišteni ugljeni hidrati su primer alternativnog izvora, kao i svi ugljenikovi atomi koji se nalaze izvan hloroplasta. Količina ugljenikovih atoma koji će ući u MEP put zavisi od vrste, stadijuma razvića lista, kao i od dužine trajanja i intenziteta stresa. Pokazano je da stres jakog intenziteta može da smanji dostupnost energetske kofaktora potrebnih za odvijanje enzimske reakcije MEP puta, što dovodi do akumuliranja intermedijera i sprečavanja formiranja finalnih proizvoda (Ghirardo i sar., 2014). Nije poznato da su iridoidi kod vrsta *Nepeta* deo odbrambenog odgovora biljaka na vodni stres, ali se njihova biosinteza i akumulacija indirektno menjaju, kao rezultat fizioloških procesa koje pokreće nedostupnost vode. Ranije studije su pokazale da vodni stres srednjeg intenziteta stimuluše produkciju specijalizovanih metabolita kod nekih vrsta roda *Nepeta* (Layeghaghghi i sar., 2015; Ramezan i Abbaszadeh, 2016; Said-Al Ahl i sar., 2016). Istraživanje u okviru ove doktorske disertacije imalo je za cilj da istraži regulatorne mehanizme, koji stoje iza odgovora biljaka na vodni stres jakog intenziteta, praćenjem promena u metabolizmu nepetalaktona kod dve endemične balkanske vrste roda *Nepeta*. Izdanci *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* bili su izloženi vodnom stresu, a zatim su nivoi ekspresije gena biosintetskog puta NL i odabranih transkripcionih faktora analizirani paralelno sa profilisanjem nepetalaktona. PEG je inertni osmolit visoke molekulske mase koji biljke ne usvajaju iz podloge, zbog čega se eksperimentalno često koristi u cilju indukcije vodnog stresa i praćenja posledica na specijalizovani metabolizam (Búfalo i sar., 2016; Razavizadeh i sar., 2019).

Gajenje na hranljivoj podlozi sa dodatkom PEG-a dovelo je do niza izmena u morfološkim i fiziološkim parametarima kod jedinki vrsta *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*. Kada se pogledaju mikrografije obe vrste, na površinama listova netretiranih biljaka koje su gajene na MS ½ tečnoj podlozi bez dodatka saharoze i PEG-a, uočavaju se otvorene stome što omogućava neometanu razmenu gasova. Jedna od prvih aktivnosti u odgovoru na vodni stres kod biljaka jeste zatvaranje stoma, kako bi se sprečio dalji gubitak vode posredstvom transpiracije. Pokazano je da prisustvo PEG-a u hranljivoj podlozi dovodi do zatvaranja stoma na površini listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*, što ukazuje na vodni stres.

Smanjena lisna površina, gubitak turgora i snižena sveža masa kod *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* dodatno ukazuju na vodni stres indukovani PEG-om. Takođe, senescencija nekih listova tretiranih biljaka ukazuje na razgradnju hlorofila i samim tim na sniženu fotosintetsku aktivnost. Intenzitet stresa procenjen je analizom *RWC* u netretiranim biljkama i biljkama gajenim na podlozi sa dodatkom PEG-a. Ovaj parametar je koristan indikator vodnog statusa, kao i otpornosti biljaka na vodni stres. Rezultati pokazuju da se u biljkama obe vrste *RWC* značajno snižava pod uticajem PEG-a u svim vremenskim tačkama eksperimenta (1DPT, 3DPT, 6DPT), a dobijene vrednosti ukazuju na to da su biljke proživljavale vodni stres jakog intenziteta (Loreto i sar., 2004). Vodni potencijal podloge iznosio je -3 MPa, a to je vrednost koja izaziva vodni stres jakog intenziteta kod većine biljaka (*Osmolovskaya* i sar., 2018). Međutim, redukcija *RWC* bila je niža kod *N. rtanjensis* nego kod *N. argolica* subsp. *argolica*, zbog čega se može pretpostaviti da ove dve vrste imaju različite odgovore na vodni stres istog intenziteta, kao i da je vrsta *N. rtanjensis* razvila efikasnije mehanizme tolerancije.

U okviru ove doktorske disertacije praćene su promene u sadržaju dominantnih iridoida u uslovima dehidracije listova indukovane PEG-om. U vrstama roda *Nepeta* proizvode se četiri stereoizomera NL, sa stereohemijama koje se razlikuju na 4a i 7a pozicijama, prisutna u različitim odnosima (Clark i sar., 1997; Eisenbraun i sar., 1980; Mišić i sar., 2015). Varijacije u stereohemiji NL generišu se u koraku cikloadicije iridoidnog biosintetskog puta i katalizuju ih enzimi iz grupe NEPS (Lichman i sar., 2019a). Istraživanje koje su sprovedeli Mišić i saradnici (2015) pokazalo je da vrste roda

Nepeta, koje dominantno proizvode *trans,cis*-NL, sintetišu u velikim količinama i DNL. S druge strane, kod vrsta, koje karakteriše prisustvo stereoizomera *cis,trans*-NL, sadržaj DNL je relativno nizak. Rezultati ove disertacije pokazali su isti trend. Naime, vrstu *N. rtanjensis* karakteriše prisustvo *trans,cis*-NL, ali i značajne količine DNL, dok *N. argolica* subsp. *argolica* dominantno akumulira *cis,trans*-NL i male količine DNL. Ova pojava se može objasniti postojanjem većeg afiniteta enzima koji katalizuje dehidrogenizaciju NL prema *trans,cis*- orijentisanom stereoizomeru, ili većom stabilnošću *cis,trans*-NL u odnosu na *trans,cis*-NL. Dalja istraživanja koja će ići u pravcu izolacije i funkcionalne karakterizacije ovih enzima, kao i analize njihovih afiniteta prema izomerima nepetalaktona, pomoći će u rasvetljavanju ove pojave.

Kao što je prethodno diskutovano, sadržaj NL u biljkama zavisi od ravnoteže između stope biosinteze i stope gubitka ovog jedinjenja. Gubitak nepetalaktona može se javiti kao posledica njegovog oslobađanja u atmosferu i/ili dalje konverzije u derivate. Biljke koje su korišćene u ovom eksperimentu gajene su u identičnim kontrolisanim uslovima *in vitro*, pri konstantnoj temperaturi, vlažnosti vazduha i svetlosnom režimu. Prema tome, može se pretpostaviti da je stopa isparavanja NL u kontrolnim biljkama odgovarala onoj koje su imale biljke gajene na podlozi sa dodatkom PEG-a. Osim toga, kod obe vrste je pokazano da vodni deficit nije izazvao morfološke promene peltatnih glandularnih trihoma, za koje je potvrđeno u rezultatima ove disertacije da su glavna mesta biosinteze i akumulacije nepetalaktona u *N. rtanjensis*, ali i u drugim vrstama ovog roda (Clark i sar., 1997, Hallahan i sar., 1998, Lichman i sar., 2019a). Efikasnost katabolizma NL u uslovima dehidratacije listova, izražena je kroz vrednosti odnosa sadržaja DNL/*trans,cis*-NL kod *N. rtanjensis*, kao i DNL/*cis,trans*-NL kod *N. argolica* subsp. *argolica*. Odnosi sadržaja DNL/*cis,trans*-NL kod biljaka tretiranih PEG-om su veoma niski u poređenju sa netretiranim biljkama, zbog niskog sadržaja DNL u ovim biljkama. Vrednosti DNL/*trans,cis*-NL u biljkama *N. rtanjensis* su bile relativno konstantne tokom šest dana PEG-tretmana. Iz ovih rezultata se može zaključiti da vodni deficit izazvan PEG-om nije imao uticaja na konverziju *trans,cis*-NL u DNL kod *N. rtanjensis*, dok je ta konverzija kod vrste *N. argolica* subsp. *argolica* intenzivirana u ovim uslovima. Dve vrste roda *Nepeta* evidentno poseduju različite strategije za očuvanje nivoa nepetalaktona tokom uslova vodnog stresa, pri čemu *N. argolica* subsp. *argolica* pokazuje veću osetljivost u inicijalnim fazama stresa.

Ranije studije, izvedene na različitim vrstama aromatičnih biljaka, pokazale su da vodni stres može da izazove snižavanje, povišavanje ili očuvanje sadržaja jedinjenja u etarskim uljima, u zavisnosti od biljne vrste i intenziteta stresa (videti Uvod **Tabela 1.**). Kada su u pitanju vrste roda *Nepeta*, maksimalni kapacitet produkcije etarskih ulja kod vrste *N. racemosa* postignut je u uslovima vodnog stresa srednjeg intenziteta (Layeghaghghi i sar., 2014). Za *N. pogonosperma* je pokazano da je tolerantna na dehidrataciju i da je sadržaj etarskog ulja najviši u uslovima vodnog stresa (Ramezan i Abbaszadeh, 2016). Pored prinosa, vodni deficit utiče i na kvalitativne promene u sastavu etarskog ulja, kako je pokazano npr. u slučaju vrste *Mentha piperita* (Búfalo i sar., 2016; Charles i sar., 1990). Slično je pokazano i u ovoj disertaciji kod vrsta *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*, kod kojih se u uslovima dehidratacije menjaju odnosi sadržaja DNL/*trans,cis*-NL i DNL/*cis,trans*-NL u listovima. Intenziviranje konverzije NL u manje isparljivi DNL može predstavljati strategiju prilagođavanja na uslove vodnog deficita i sprečavanje gubitka nepetalaktona. S druge strane, kod vrste *A. annua* pokazano je da dehidratacija dovodi do redukcije gustine žlezdanih dlaka na površini listova, što za rezultat ima sniženi sadržaj etarskog ulja. (Yadav i sar., 2014). Odgovor biljke na vodni deficit zavisi od genotipa, razvojnog stadijuma, starosti biljke, kao i od intenziteta i dužine trajanja nepovoljnih uslova (Bray, 1993, 1997).

Ekspresija gena kandidata *GPPS*, *GES*, *G8O*, *8HGO*, *IS1* i *IS2* analizirana je u listovima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* u različitim vremenskim tačkama od početka PEG-tretmana (1DPT, 3DPT i 6DPT), u tretiranim i netretiranim biljkama. Takođe, ispraćena je promena nivoa

aktivnog heteromernog GPPS enzima, tako što *SSU* iz ovog kompleksa remodeluje *LSU* za sintezu geranil pirofosfata (C10-GPP). Zbog toga se smatra da *SSU* subjedinica direktno kontroliše produkciju isparljivih monoterpena kod *M. piperita* (Chang i sar., 2010). Takođe, druge studije na vrstama iz porodice Lamiaceae potvrđuju regulatornu ulogu ove subjedinice u biosintezi monoterpena (Rai i sar., 2013; Schmidt i sar., 2010; Wang i Dixon, 2009). Zbog svega ovoga, u ovoj disertaciji analizirana je ekspresija gena koji kodira za malu subjedinicu enzima GPPS kod dve vrste *Nepeta* (*NrGPPS-SSU* i *NaGPPS-SSU*). Smatra se da GES kontroliše stopu biosinteze iridoida, jer je ovaj enzim odgovoran za preusmeravanje metaboličkog fluksa sa kanonskih monoterpena ka iridoidima konverzijom GPP u geraniol (Boachon i sar., 2018). Sledeći korak katalizuje enzim G8O, koji konvertuje geraniol u 8-hidroksigeraniol, a njega dalje 8HGO prevodi u 8-oksogeranial. Kod vrste *C. roseus* pokazano je da G8O i 8HGO mogu da vezuju kao supstart 8-hidroksigeraniol i da proizvode intermedijer 8-oksogeraniol. Enzim G8O može da obavlja ovu reakciju samo u jednom pravcu, dok 8HGO može da katalizuje i reverznu reakciju (Miettinen i sar., 2014). Prema tome, može doći do delimičnog preklapanja u oksidacionim reakcijama, u kojima enzimi G8O i 8HGO produkuju 8-oksogeraniol i 8-hidroksigeraniol. Dve izoforme enzima 8HGO su izolovane iz vrste *C. roseus*, a to su 8HGOA (KF302069; Miettinen et al., 2014) i 8HGOB (AY352047; Krithika et al., 2015). Genska sekvenca koja je identifikovana u transkriptomu *N. rtanjensis* i analizirana u okviru ove disertacije (*Nr8HGO*) sličnija je sekvenci *Cr8HGOA*.

Naredni korak biosintetskog puta iridoida katalizuje enzim iridoid sintaza (IS). Nakon što je prvi put otkrivena CrIS u *C. roseus* (Geu-Flores i sar., 2012), iridoid sintaze su funkcionalno okarakterisane u različitim vrstama koje proizvode iridoide (Alagna i sar., 2016; Kries i sar., 2017; Xiang i sar., 2017), a nedavno i u *Nepeta cataria* i *N. mussinii* (Sherden i sar., 2017). Pokazano je da iridoid sintaza iz vrsta roda *Nepeta* redukuje i aktivira 8-oksogeranial do enolnog intermedijera, ali ne katalizuje naredni korak ciklizacije do nepetalaktola (Lichman i sar., 2019a; Sherden i sar., 2017). Potvrđeno je da novootkriveni enzimi MLPL (eng. *major latex protein-like*, *MLPL*) kod vrsta *N. mussinii* i *N. cataria* u konjukciji sa IS značajno povišavaju sadržaj *cis,trans*-nepetalaktola u enzimskim reakcijama *in vitro* (Lichman i sar., 2020). U transkriptomu *N. rtanjensis* su identifikovana dva gena kandidata za iridoid sinataze i promene njihovih ekspresija su praćene u listovima *N. rtanjensis* (*NrIS1* i *NrIS2*) i *N. argolica* subsp. *argolica* (*NaIS1* i *NaIS2*) u uslovima dehidratacije indukovane PEG-om. U nedavnoj publikaciji otkrivena je funkcija enzima NEPS, koji kao supstrat prihvataju 8-oksocitronelil enol/enolat i vrše njihovu ciklizaciju do *cis,trans*-NL (*NmNEPS1* i *NmNEPS2*) ili *cis,cis*-NL (*NmNEPS3*). Finalni korak u produkciji NL, odnosno reakciju oksidacije *cis,trans*- i *cis,cis*-nepetalaktola do *cis,trans*- i *cis,cis*-NL, katalizuje samo *NmNEPS1* (Lichman i sar., 2019a,b). Najnovije istraživanje otkrilo je *trans,cis*-ciklaze – *NmNEPS4* i *NcNEPS4*, koje katalizuju formiranje *trans,cis*-nepetalaktola kod vrsta *N. mussinii* i *N. cataria*, nakon čega sledi oksidacija do *trans,cis*-NL posredstvom enzima NEPS1 (Lichman i sar., 2020). Takođe, u istom radu otkrivene su i nove dehidrogenoze *NmNEPS5* i *NcNEPS5*, koje katalizuju formiranje *cis,cis*-NL, *cis,trans*-NL i *trans,cis*-NL. Funkcije ovih gena je dodatno potvrdila pozitivna korelacija njihovih ekspresija sa sadržajem tri stereoizomera nepetalaktona (*cis,cis*-NL, *cis,trans*-NL i *trans,cis*-NL) u tkivima *N. cataria* i *N. mussinii*.

Pretpostavljeno je da enzimi sa sekvencama homologim onima iz *N. mussinii* (*NmNEPS1*, *NmNEPS2* i *NmNEPS3*) katalizuju iste reakcije u *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*. Geni kandidati za NEPS su pronađeni u transkriptomu *N. rtanjensis* i korišćeni su isti setovi prajmera za analizu ekspresije ovih gena u listovima *N. rtanjensis* (*NrNEPS1a*, *NrNEPS1b*, *NrNEPS2* i *NrNEPS3*) i *N. argolica* subsp. *argolica* (*NaNEPS2* i *NaNEPS3*). Transkripti *NEPS1a* i *NEPS1b* nisu zabeleženi u *N. argolica* subsp. *argolica*, vrsti koja je bogata *cis,trans*-NL. Uprkos srodnosti dve ispitivane vrste metvice, prajmeri nisu uspeli da amplifikuju *NEPS1* kod *N. argolica* subsp. *argolica*. Verovatno se u regionima

za vezivanje prajmera specifičnih za *N. rtanjensis* nalaze određene strukturne razlike u odnosu na *NrNEPS1*.

Brojne publikacije navode da vodni deficit utiče na opadanje sadržaja specijalizovanih metabolita u biljnim tkivima, verovatno zbog negativne regulacije ekspresije gena njihovih biosintetskih puteva. Primera radi, dugotrajni vodni deficit istovremeno snižava ekspresiju gena biosintetskog puta artemisinina i sadržaj ovog jedinjenja u etarskom ulju *A. annua* (Yadav i sar., 2014). Dehidratacija pod uticajem PEG-a dovela je do snižavanja ekspresije većine biosintetskih gena uključenih u metabolizam NL, što rezultira sniženim metaboličkim fluksom kroz ovaj biosintetski put. Kvantifikacija metabolita potvrđuje sniženi fluks, naročito kod *N. argolica* subsp. *argolica*, gde su evidentirane niže vrednosti *cis,trans*-NL i DNL. Kod vrste *N. rtanjensis* ovo je manje izraženo, jer je značajno sniženje *trans,cis*-NL nakon 1DPT, dok je DNL snižen nakon 1DPT i 3DPT. Nakon 6DPT nema razlike u količini DNL u tretiranim i netretiranim jedinkama obe vrste, što verovatno ukazuje na to da su se biljke prilagodile na uslove stresa usmeravanjem konverzije NL u manje isparljivi DNL.

Produkcija specijalizovanih metabolita zahteva veliki utrošak energije, i smatra se da mašinerija koja učestvuje u procesu biosinteze ovih jedinjenja može biti ili stalno aktivna kao glavna linija odbrane i adaptacije biljke na ekološku nišu (konstitutivna produkcija), ili povremeno pokrenuta u situacijama kada se biljka nađe u opasnosti (indukovana produkcija). U zavisnosti od genotipa, razvojnog stadijuma biljke, dužine trajanja i intenziteta nepovoljnih uslova, abiotički stres može dovesti i do redukcije konstitutivne ili indukovane produkcije specijalizovanih metabolita. Regulacija biosinteze specijalizovanih metabolita se pretežno odvija na transkripcionom nivou i uključuje kombinatnu aktivnost specifičnih transkripcionih faktora (TF). Unutrašnji signali, koji se stvaraju tokom različitih razvojnih faza ili u okviru specijalizovanih anatomskih struktura i/ili spoljašnji signali, kao što su promene sredinskih faktora, modifikuju aktivnosti ovih TF, a uzročno/posledično i nivo transkripcije gena koji učestvuju u metaboličkim putevima (Colinas i Goossens, 2018).

Biosintetski put iridoida je u kompeticiji za kofaktore i prekursore sa primarnim metabolizmom, ali i sa drugim granama biosinteze terpenoida, kao i drugih klasa specijalizovanih metabolita (npr. fenolna jedinjenja). Pored toga, ovaj biosintetski put ima složenu prostornu organizaciju, tako da se njegovi pojedinačni delovi odvijaju u odvojenim organelama, ćelijama, ili čak tkivima i organima, zbog čega je za biosintezu neophodna precizna transkripciona koordinacija gena (Goossens i sar., 2017). Za razliku od biosintetskih enzima specifičnih za vrste, koji katalizuju reakcije u metaboličkim putevima, regulatorni TF su često evolutivno veoma konzervirani kod različitih biljnih vrsta (Goossens i sar., 2017; Zhou i Memelink, 2016). Razumevanje ovih regulatornih mreža je značajno napredovalo zahvaljujući skorašnjim istraživanjima, u kojima su rasvetljeni TF koji kontrolišu različite grane biosintetskog puta monoterpenskih indol alkaloida (MIA) kod *C. roseus* (Van Moerkercke i sar., 2015, Patra i sar., 2018).

Biljke proizvode jasmonsku kiselinu ili njene derivate, kao odgovor na različite impulse prouzrokovane procesima razvića biljke ili faktorima stresa, što uglavnom dovodi do delimičnog preusmeravanja gradivnih blokova i energije sa rastenja, razvića i značajnih fizioloških procesa na odbranu i sintezu različitih specijalizovanih metabolita (Goossens i sar., 2016). Signalna kaskada otpočinje bioaktivacijom JA u enzimskoj reakciji u kojoj dolazi do spajanja JA sa aminokiselinom izoleucinom (Ile). Nastaje kompleks JA-Ile, koji funkcioniše kao ligand za koji se vezuje F-boks protein COI1. U sledećem koraku, proteinski kompleks *Skp-Cullin-F-boks*, koji sadrži COI1 (SCF^{COI1}), degraduje transkripcioni represor JAZ. Dalje, JAZ intereaguje sa velikim brojem TF koji imaju različite uloge u regulaciji ekspresije grupe gena pod uticajem jasmonata (eng. *JA-responsive genes*). Degradacija JAZ proteina dovodi do oslobađanja TF, koji aktiviraju ciljne gene (Pérez i Goossens, 2013; Wasternack i Hause, 2013). Signalna kaskada posredovana JA dovodi do aktiviranja centralnog regulatora TF MYC2 koji indukuje ekspresiju brojnih signalnih gena, kao i gena specijalizovanog metabolizma.

Signalna kaskada posredovana *JA* je potpuno istražena kod vrste *C. roseus* i pokazano je da pospešuje produkciju MIA, tako što indukuje koordinisanu ekspresiju svih gena, koji učestvuju u biosintetskom putu ovih jedinjenja (*Goossens* i sar., 2016; *Miettinen* i sar., 2014; *Zhou* i sar., 2014). Na osnovu ovih saznanja pretpostavljeno je da je i biosinteza NL kod vrsta roda *Nepeta* pod kontrolom ove signalne kaskade. Naime, u transkriptomu *N. rtanjensis* su pronađeni pretpostavljeni geni, koji kodiraju za *COI1*, *JAZ3* i *MYC2*, dok nije bilo podudarnosti sa sekvencama koje odgovaraju *BIS* i *ORCA* grupama TF. Takođe, identifikovani su i TF koji su specifični za metabolizam monoterpena u glandularnim trihomima porodice Lamiaceae. Zbog toga su analizirane promene u nivoima ekspresije gena, koji pokazuju visok procenat sličnosti sa *MsMYB* i *MsYABBY5* – regulatorima biosintetskog puta monoterpena u *M. spicata* (*Wang* i sar., 2016, *Reddy* i sar., 2017). Promene u nivoima ekspresije pet pretpostavljenih gena koji kodiraju za TF (*COI1*, *JAZ3*, *MYC2*, *MYB* i *YABBY5*) praćene su u listovima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* tokom dehidratacije izazvane PEG-om, a zatim su analizirane korelacije ovih vrednosti sa nivoima ekspresije gena NL biosintetskog puta.

Kod obe vrste roda *Nepeta* ekspresija pretpostavljenih gena za *COI1* i *JAZ3* bila je ujednačena tokom čitavog trajanja eksperimenta. Nepromenjeni nivoi ekspresije *COI1* i *JAZ3* ukazuju da *JA* nije dominantan deo regulatorne mreže biosinteze NL u uslovima vodnog stresa jakog intenziteta, ili da se ova signalna kaskada pokreće veoma brzo u odgovoru na stres, u vremenskim intervalima kraćim od jednog dana, što nije analizirano u ovom eksperimentu. U prilog drugoj hipotezi idu rezultati ranijih istraživanja, koji potvrđuju da koncentracija *JA* fluktuiraju i da se akumulira tokom ranog odgovora na vodni stres (*de Ollas* i *Dodd*, 2016). Takođe, pokazano je da se pod uticajem vodnog stresa favorizuje akumulacija *ABA*, kao i *JA* prekursora 12-OPDA, tako što se sprečava njegova dalja konverzija u *JA* i time blokira *JA*-signalni put (*Savchenko* i sar., 2014). Iako su nivoi ekspresije *COI1* i *JAZ3* bili stabilni, nivoi transkripata *MYC2* su bili značajno sniženi kod jedinki *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*, tako da su pratili obrasce ekspresije većine gena biosintetskog puta NL. Pošto je poznato da je *MYC2* signalni centar, gde se preklapaju signalni putevi različitih fitohormona, smisleno je pretpostaviti da *ABA* kontroliše nivoe ekspresije *MYC2* u listovima dve vrste *Nepeta* tokom vodnog stresa jakog intenziteta. Za razliku od *JA*, koncentracije *ABA*, glavnog hormona koji reguliše odgovor na vodni stres, obično se povećavaju sa padom nivoa vode u biljnim tkivima (*Puértolas* i sar., 2013).

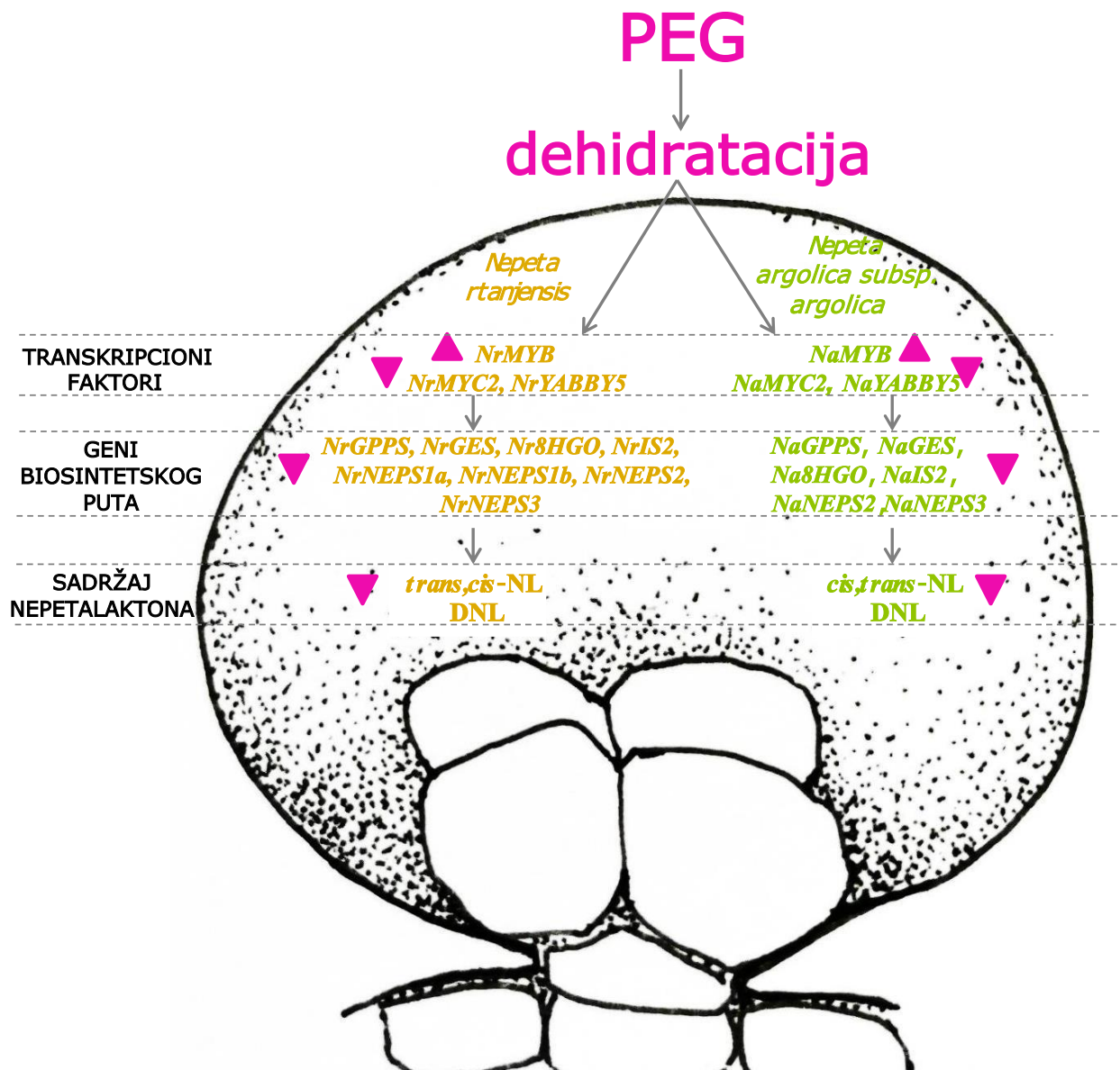
Obrasce ekspresije gena *NrMYB* i *NaMYB*, u netretiranim jedinkama dve vrste *Nepeta* i onim izloženim uslovima dehidratacije pomoću PEG, suprotni su u odnosu na obrasce zabeležene kod gena biosintetskog puta NL. Slični rezultati dobijeni su za TF *OpMYB1*, koji je regulator biosinteze kamptotehina i ima ulogu negativnog regulatora početnih koraka u biosintezi MIA (*Rohani* i sar., 2016). Ranija istraživanja pokazuju da je i *MsMYB* negativni regulator biosinteze monoterpena kod *M. spicata*, tako što se vezuje za *cis*-element *MsGPPS.LSU* i suprimira ekspresiju ovog gena (*Reddy* i sar., 2017). Filogenetska analiza je otkrila visok nivo homologije između sekvenci *NrMYB* i *MsMYB*, što dodatno potvrđuje pretpostavku da je *NrMYB* negativni regulator biosinteze NL.

Porodicu proteina *YABBY* čine TF koji su specifični za biljke i za koje je poznato da regulišu različite faze razvoja vegetativnih i reproduktivnih organa (*Bonaccorso* i sar., 2012), kao i produkciju monoterpena (*Wang* i sar., 2016). Pokazano je da se *MsYABBY5* dominantno eksprimira u peltatnim glandularnim trihomima listova *M. spicata* i da suprimiranje ovog TF dovodi do većeg prinosa monoterpena u nani. Takođe, ista studija je pokazala da ektopična ekspresija gena *MsYABBY5* snižava proizvodnju terpena kod *Nicotiana sylvestris* i *Ocimum basilicum*, što ukazuje na to da je TF, koji ovaj gen kodira, represor specijalizovanog metabolizma. Druga istraživanja su pokazala da TF iz porodice *YABBY* mogu imati ulogu ili represora ili aktivatora, tako da su bifunkcionalni (*Bonaccorso* i sar., 2012, *Stahle* i sar., 2009). Nivoi ekspresije *NrYABBY5* i *NaYABBY5* bili su sniženi u listovima dve vrste *Nepeta* tokom dehidratacije izazvane PEG-om, tako da su pratili obrasce promena vrednosti ekspresije gena

biosintetskog puta NL. Ovi rezultati navode na pretpostavku da su NrYABBY5 i NaYABBY5 pozitivni regulatori biosinteze NL.

U sistemskoj biologiji važi pretpostavka da je grupa gena koja učestvuje u istom biološkom procesu, kao što je biosintetski put specijalizovanog metabolita, ko-regulisana i ko-ekspimirana pod kontrolom zajedničkog regulatornog sistema. Ovo je tipičan primer principa tzv. „krivice zbog udruživanja” (eng. „*guilt-by-association*”), koji pretpostavlja da geni istog biosintetskog puta imaju iste obrasce ekspresije u odgovoru na određene sredinske uslove (Wisecaver i sar., 2017, Zhang i sar., 2018). Na osnovu ovog principa, korelacije genske ko-ekspresije su često upotrebljavane da bi se identifikovali nepoznati geni specijalizovanog metabolizma u biljkama, kada su dostupni transkriptomski podaci i rezultati ekspresije velikog broja gena (npr. mikroareji). Nakon toga, reverzni genetički i biohemijski eksperimenti bi najčešće potvrdili funkcije ovako identifikovanih gena kandidata (Zhang i sar., 2018). Na ovaj način su rasvetljeni regulatorni mehanizmi i strukturni geni biosintetskih puteva različitih metabolita kod mnogih vrsta, kao što su *A. thaliana*, *Cannabis sativa*, *Papaver somniferum*, *Solanum lycopersicum* i *C. roseus* (Higashi i Saito, 2013, Zhang i sar., 2018).

Prema navedenom principu, pozitivna korelacija većine gena biosintetskog puta NL kod *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* tokom vodnog stresa, potvrđuje njihove identitete i funkcije u zajedničkom biosintetskom putu. Kod obe vrste ekspresija pretpostavljenog gena za G8O nije u korelaciji sa drugim strukturnim genima NL biosintetskog puta. Stabilnu ekspresiju gena *G8O* je moguće objasniti njegovom funkcijom kontrolora fluksa ugljenika iz primarnog ka specijalizovanom metabolizmu i iridoidnom putu, kao što je pokazano kod *C. roseus* (Pan i sar., 2016). Takođe, zabeleženo je da *CrG8O* može imati obrasce ekspresije suprotne drugim genima biosintetskog puta sekologanina u *C. roseus* (Kidd i sar., 2019). Osim toga, pokazano je i da *CrG8O* može imati dualnu aktivnost u dva odvojena biosintetska puta – terpenoidnom i fenilpropanoidnom (Sung i sar., 2011). Prema tome, nije isključeno da ovaj enzim preuzima i druge uloge u uslovima vodnog deficita kod *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*. Kod vrste *N. rtanjensis* *NrIS1* nije klasterovan sa drugim genima NL biosintetskog puta, što može upućivati na zaključak da ova izoforma nije aktivna u biosintezi NL tokom vodnog stresa. Saglasno sa tim, u ovoj disertaciji *NrIS1* i *NaIS1* nisu funkcionalno okarakterisane u enzimskim esejima *in vitro*, a prikazano je i da su sekvence *NrIS1* i *NaIS1* filogenetski bliske sa manje aktivnom familijom 1 iridoid sintaza iz *Nepeta* (Sherden i sar., 2017). Kod obe vrste *NEPS3* nije u korelaciji sa drugim genima NL biosintetskog puta, zbog čega se pretpostavlja da enzim za koji kodira ne učestvuje u biosintezi NL tokom dehidratacije. Po prvi put u vrstama roda *Nepeta*, ovde prikazani *HCA* rezultati otkrivaju i potencijalne regulatore biosintetskog puta NL. Naime, kao pozitivni regulatori biosinteze NL kod obe vrste *Nepeta* izdvajaju se TF MYC2 i YABBY5, čije su ekspresije gena u pozitivnoj korelaciji sa većinom strukturnih gena ovog puta. Uzevši u obzir da su ovi TF, zajedno sa biosintetskim genima, zajedno ekspimirani u trihomima na listovima, MYC2 i YABBY5 predstavljaju dobre kandidate za metabolički inženjering. Buduća istraživanja, koja će se baviti ekspresijom ovih gena u heterologim sistemima i *in vitro* esejima sa rekombinantnim enzimima, imaće zadatak da utvrde funkcije ovih TF u metabolizmu NL.



Slika 46. Prikaz rezultata eksperimenta dehidratacije izazvane PEG-om kod jedinki *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*

U odgovoru na dehidrataciju indukovanu PEG-om, ekspresija većine pretpostavljenih gena biosintetskog puta NL i transkripcionih faktora se snižava, kao i sadržaj metabolita (**Slika 46.**), što ukazuje na to da je biosinteza NL regulisana na nivou genske ekspresije. Ovo je manje uočljivo kod jedinki *N. rtanjensis*, u čijim listovima je koncentracija NL ostala relativno stabilna tokom dehidratacije, uprkos tome što je metabolički fluks kroz iridoidni put bio snižen. Budući da su trihomi listova *N. rtanjensis* obogaćeni transkriptima *NrMYC2*, *NrYABBY5* i genima biosintetskog puta NL, kao i da su nivoi ekspresije ovih gena u listovima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* pozitivno korelisane tokom dehidratacije, može se pretpostaviti da su ovi TF pozitivni regulatori biosinteze NL.

5.3. Funkcionalne iridoid sintaze nalaze se u vrstama roda *Nepeta* koje proizvode nepetalakton, ali i u onima koje ga ne proizvode

Transkriptomi, kao baze celokupnih RNK koje se transkribuju sa genoma, od ključne su važnosti za otkrivanje funkcionalnih gena kod biljaka kojima nije sekvenciran genom. Pre pronalaska dubokog sekvenciranja, mikroareji su najviše korišćeni za analizu transkripata. Poslednjih decenija, razvoj i upotreba NGS je poboljšala efikasnost prilikom otkrivanja gena odgovornih za produkciju aktivnih jedinjenja medicinskih biljaka. Ceo proces uključuje korake od pripreme biljnog materijala, preko pripreme cDNK biblioteke, do dubokog sekvenciranja i, na kraju, bioinformatičkog asembliranja obilja fragmentarnih podataka do smislenih informacija o sekvencama. Kada transkriptomska baza neke biljne vrste nije dostupna, ciljni gen kandidat se može izolovati na osnovu homologije sa poznatim i javno dostupnim sličnim sekvencama istih funkcija poreklom iz srodnih vrsta. Tada se na osnovu konzerviranih regiona u tim sekvencama dizajniraju tzv. degenerativni prajmeri – smeša sličnih, ali ne i identičnih prajmera koji sadrže supstitucije nukleotida na tačno određenim pozicijama u sekvenci. Pomoću degenerativnih prajmera se amplifikuju geni kandidati, a njihove sekvence se otkrivaju nakon sekvenciranja ovako izolovanih pojedinačnih gena, što je daleko jeftiniji pristup od dubokog sekvenciranja celog transkriptoma, ali istovremeno i dugotrajniji. Velike genske familije, kao što su terpen sintaze, sa poznatim konzerviranim motivima i domenima, uspešno su izolovane pomoću degenerativnih prajmera iz različitih biljnih vrsta (Markus Lange i Turner, 2012).

Na osnovu nukleotidnih genskih sekvenci može se sa sigurnošću predvideti primarna struktura, odnosno aminokiselinska sekvenca proteina. Sličnosti između analiziranih transkripata i funkcionalno okarakterisanih gena dostupnih u javnim bazama podataka mogu nagovestiti njihove uloge. Međutim, sama sličnost između sekvenci ne govori sa sigurnošću da se radi o genima identičnih funkcija, jer već male razlike od nekoliko nukleotida u sekvencama mogu potpuno promeniti specifičnost enzima za određeni supstrat ili proizvod. Kako bi se gen funkcionalno okarakterisao često se koriste *in vitro* biohemijski eseji sa rekombinantnim enzimima i pretpostavljenim supstratima. Rekombinantni proteini se dobijaju kloniranjem cDNK gena od interesa u ekspresione vektore, a zatim eksprimiranjem u odgovarajućim organizmima domaćinima. Najčešće korišćeni organizmi domaćini su bakterija *E. coli*, kvasci (*Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris*), ali i biljke (*Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum* i *Physcomitrella patens*). Svi navedeni organizmi domaćini, bilo da su biljke ili mikroorganizmi, odlikuju se nekim prednostima i nedostacima. Kod izbora organizma domaćina mora se uzeti u obzir sama priroda enzima od interesa, odnosno njegove fizičko-hemijske karakteristike, biološke aktivnosti, kao i mesto u biljnoj ćeliji gde se sintetiše.

E. coli je već decenijama preferirani organizam domaćin za produkciju rekombinantnih proteina. Prednosti korišćenja *E. coli* su brz rast bakterijskih kultura, mogućnost kontinualne fermentacije, kao i niska cena. Standardne metode rekombinantne ekspresije zahtevaju prečišćavanje solubilnog proteina sa polihistidinskim obeleživačem. Kada ekspresija enzima od interesa u *E. coli* stvara insolubilne agregacije u inkluzionim telima, vezivanje N- ili C- kraja za protein koji se vezuje za maltozu ili glutation S-transferazu povećava solubilnost proteina. Danas su komercijalno dostupni brojni modifikovani ekspresioni sojevi *E. coli* za rešavanje raznih tehničkih poteškoća u rekombinantnoj ekspresiji. Takav je soj *Rosetta* koji povećava ekspresiju eukariotskih proteina sa kodonima retkim u *E. coli*. (Novy i sar., 2001) ili *ArcticExpress* soj, koji sprečava da protein zauzme pogrešnu konformaciju i dozvoljava bakterijski rast i ekspresiju na 12 °C. *E. coli* sistemi su upotrebljavani za rekombinantnu ekspresiju i funkcionalnu karakterizaciju velikog broja gena koji učestvuju u biosintezi monoterpena kod porodice Lamiaceae. Neki od primera su menton reduktaza iz *Mentha piperita*, enzim koji je aktivan u metabolizmu mentona (Davis i sar., 2005), i (4S)-limonen sintaza iz *M. spicata* (Colby i sar., 1993). Neke familije enzima, kojima često pripadaju učesnici biljnog specijalizovanog metabolizma, vezani su za membranu ćelije ili im je potreban specifičan tip eukariotske posttranslacione modifikacije, što

predstavlja izazov za ekspresiju u bakterijama *E. coli*. Tu spada, na primer, familija enzima P450 koji su vezani za membranu endoplazmatičnog retikuluma. U slučaju ovakvih enzima, *S. cerevisiae* se koristi kao domaćin organizam. Iako se ređe upotrebljavaju, i drugi heterologi sistemi ekspresije, kao što su kvasac *P. pastoris* (Krainer i sar., 2014) i ćelije insekata (*Druzinec* i sar., 2013), uspešni su kod rekombinantne ekspresije enzima eukariotskih specijalizovanih metabolita. Nakon ekspresije u organizmu domaćinu i prečišćavanja, funkcija rekombinantnog enzima može se ispitivati u biohemijskim esejima *in vitro* u reakcijama sa pretpostavljenim supstratom, gde se prati njegova konverzija u očekivani proizvod i aktivnost enzima. Takođe, poslednjih godina se često proizvode tranzijentni proteini u listovima *Nicotiana benthamiana*, pri čemu se prenos transgena vrši posredstvom sojeva bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Prednosti ove metode, koja je poznata pod terminom agroinfiltracija, su mogućnost brze potvrde metaboličke funkcije enzima *in vivo*, ali i visok prinos u proizvodnji eukariotskih proteina (Goodin i sar., 2008).

5.3.1. Izolacija i funkcionalna karakterizacija iridoid sintaza iz tri vrste roda *Nepeta*

U okviru ove disertacije potvrđeno je da su glandularni trihomi glavna mesta akumulacije nepetalaktona u listovima *N. rtanjensis*, kao i da se biosinteza ovih jedinjenja odvija u ovim anatomskim strukturama. Kao što je već spomenuto, glandularni trihomi su mesta intenzivnog metabolizma terpena i fenilpropanoida, a zahvaljujući podacima različitih „omika” u prethodnim decenijama otkriveni su i brojni metabolički putevi porodice Lamiaceae u ovim strukturama. Razvoj dubljeg sekvenciranja je bio od ključne važnosti za rasvetljavanje biosinteze specijalizovanih metabolita na molekularnom nivou, jer se većina gena specijalizovanog metabolizma odlikuje niskim nivoom ekspresije u biljnim tkivima. Pokazano je da su nivoi transkriptata *P5βR1* u listovima *D. lanata* veoma niski (Herl i sar., 2006a). Zbog toga, kako bi se amplifikovao fragment gena kandidata za iridoid sintazu pomoću degenerativnih prajmera, kao matrica je korišćena cDNK trihoma, koji su izolovani sa površine listova *N. rtanjensis* abrazijom suvim ledom. Kako transkriptom *N. rtanjensis* nije bio dostupan kada su započeti ovi eksperimenti, primenjena je strategija zasnovana na homologiji sekvenci pretpostavljenih progesteron-5β-reduktaza (*P5βR*) iz srodnih vrsta porodice Lamiaceae i iridoid sintaze iz *C. roseus* (CrIS), pri čemu su dizajnirani degenerativni prajmeri na osnovu konzerviranih regiona. Na ovaj način su otkriveni geni biosintetskog puta antocijana kod *Perilla frutescens* (Gong i sar., 1997) i sekvence monoterpen sintaza kod lavande i žalfije (Landmann i sar., 2007, Wise i sar., 1998). Iz cDNK izolata trihoma pomoću degenerativnih prajmera izolovane su i limonen hidroksilaze iz *M. piperita* i *M. spicata* (Lupien i sar., 1999), kao i linalol sintaza iz *M. citrata* (Crowell i sar., 2002). Gen koji kodira za prvi enzim u biosintezi artemizina u trihomima *A. annua* – amorfa-4,11-dien sintazu, kloniran je pomoću strategije bazirane na homologiji sa poznatim terpen sintazama (Mercke i sar., 2000, Chang i sar., 2000, Wallaart i sar., 2001).

Najpre su izolovani fragmenti dve različite sekvence gena kandidata za iridoid sintazu iz glandularnih trihoma *N. rtanjensis* (*NrIS1_fr* i *NrIS2_fr*), što su potvrdili rezultati sekvenciranja. Visoka procentualna sličnost ovih fragmenata sa *P5βR* iz srodnih vrsta porodice Lamiaceae nagoveštavala je njihove identitete. Na osnovu poznatih fragmenata pomoću *RACE* tehnike otkriveni su i start i stop kodoni sekvenci, a potom i pune dužine tri gena kandidata iz *N. rtanjensis*. Pomoću istih prajmera za izolaciju pune dužine gena izolovani su i homologni geni kandidati za IS iz *N. argolica* subsp. *argolica*, *N. parnassica*, *N. ernesti-mayeri*, *N. sibirica* i *N. nervosa*. Veliki broj izolovanih klonova iz roda *Nepeta* svedeni su na sedam različitih grupa sekvenci potencijalnih IS. Poređenje ovih sekvenci sa okarakterisanim IS iz različitih vrsta, kao i sa pretpostavljenim *P5βR* iz porodice Lamiaceae, pokazao je visok stepen sličnosti.

Proteinske sekvence enzima iz *PRISE* grupe odlikuju se veoma konzerviranim aminokiselinskim regionima i visokim procentom međusobne sličnosti. Pokazano je da proteini ove grupe sadrže šest konzerviranih motiva, a njihove funkcije su određene kod $P5\beta R$ iz *D. lanata* (Thorn i sar., 2008). Višestruko poravnanje aminokiselinskih sekvenci otkriva prisustvo svih šest motiva kod izolovanih gena kandidata za IS iz vrsta roda *Nepeta*, čime se dodatno potvrđuje njihov identitet i pripadnost grupi *PRISE* enzima. Motivi I, II i III su značajni za vezivanje kofaktora $NADP^+$. Motivi IV i V sadrže ostatke esencijalne za katalizu enzima (Lys147 i Tyr179, numeracija u odnosu na $DIP5\beta R$). Ostaci Arg202 i Pro203 iz motiva VI zaduženi su za jonske interakcije i pravilno pozicioniranje katalitičkih ostataka iz motiva IV i V. Kristalne strukture ovih proteina iz različitih vrsta (uključujući $P5\beta R$ iz *D. lanata* – $DIP5\beta R$, *A. thaliana* – $AtP5\beta R$ i CrIS iz *C. roseus* itd.) modelovane su *in silico* na osnovu homologije i pokazano je da poseduju slična aminokiselinska jezgra oko katalitičkih centara (Thorn i sar. 2008). Međutim, i pored strukturnih sličnosti, ovi enzimi ispoljavaju velike razlike u katalitičkoj aktivnosti prema različitim supstratima. Kao naročito značajne pozicije za efikasnu konverziju manjih polarnih supstrata, kao što je 2-cikloheksan-1-on, Petersen i sar. (2015.) izdvajaju fenilalanine F153 i F343 (numeracija izvedena u odnosu na CrIS) na obodima vezujućeg domena, koji, s druge strane, ometaju vezivanje krupnog molekula progesterona. Ostaci F153 nisu detektovani kod NrIS2 i NeIS2a, dok su F343 prisutni kod svih IS iz *Nepeta*. Ostaci Tyr178 i Phe342 su esencijalni za katalizu enzima iz ove grupe (Kries i sar., 2016 i Hu i sar., 2015).

Filogenetska analiza razdvaja dva klastera peptidnih sekvenci iz grupe *PRISE*, što je pokazano i u nekim od prethodnih radova (Bauer i sar., 2010, Schmidt i sar., 2018). Pokazano je da su IS iz vrsta roda *Nepeta* srodnije sa pretpostavljenim $P5\beta R$ iz vrsta Lamiaceae, nego sa sekvencama okarakterisanih iridoid sintaza iz drugih vrsta (CrIS, AmIS, OeIS, LjIS i CaIS). Interesantno je da se dve $P5\beta R$ iz roda *Digitalis* razdvajaju u ovoj analizi, pri čemu je konstitutivno eksprimirana izoforma iz familije 1 ($DIP5\beta R1$) srodnija sekvencama iz porodice Lamiaceae i IS iz *Nepeta*, dok je izoforma koju indukuju faktori stresa – $DpP5\beta R2$, bliža funkcionalno okarakterisanim IS iz vrsta drugih porodica (Pérez-Bermúdez i sar., 2010). U ranijim istraživanjima primećeno je da vrste različitih rodova (npr. *Populus*, *Vitis*, *Olea*, *Catharanthus*) poseduju paraloge sekvence, koje formiraju dva različita klastera – sa $DIP5\beta R1$ ili sa $DpP5\beta R2$ (Bauer i sar., 2010, Alagna i sar., 2016), dok su sve poznate sekvence iz roda *Nepeta* pozicionirane u klasteru 1 $DIP5\beta R$. Može se zapaziti da prikazani rezultati filogenetske analize jasno odražavaju srodnost taksona iz kojih su izolovane sekvence koje kodiraju za *PRISE* enzime, zbog čega se može pretpostaviti da su oni potencijalno dobri taksonomski markeri. Takođe, ovime je potvrđeno da geni koji kodiraju za ove enzime vode poreklo od istog predačkog gena. U prilog ovome, filogenetska analiza 21 genske sekvence $P5\beta R$ iz različitih vrsta roda *Digitalis* (Lamiales, Plantaginaceae) dala je novi uvid u filogenetske i biogeografske odnose u okviru sekcija ovog roda i pokazala se veoma korisnom za razumevanje evolucije ovih biljnih vrsta (Herl i sar., 2008). Na isti način, rekonstrukcija evolutivne istorije terpen sintaza, na osnovu arhitekture njihovih genskih sekvenci, izdvojila ih je kao pouzdane molekularne markere za utvrđivanje srodnosti biljnih vrsta (Trapp i Croteau, 2001). Takođe, nedavno istraživanje je potvrdilo hipotezu da su duplikacija „promiskuitetnog” predačkog gena iz grupe *PRISE* sa slabom aktivnošću IS i selektivni pritisak doveli do neofunkcionalizacije ovih enzima i uspostavljanja biosinteze iridoida kod vrsta roda *Nepeta* (Lichman i sar., 2020). Peptidne sekvence IS iz vrsta roda *Nepeta* dalje se razdvajaju na dve grupe. Prvoj grupi pripadaju sekvence familije 1 IS iz *N. cataria* (NcIS1) i *N. mussinii* (NmIS1), kao i NaIS1, NpIS1a, NnIS i NsIS. Pokazano je da su IS iz familije 1 manje aktivne, jer je u enzimskim esejima *in vitro* detektovan *cis,trans*-nepetalaktol samo u tragovima (Sherden i sar., 2017). Drugu grupu obrazuju sekvence familije 2 (NcIS2 i NmIS2), kao i NrIS2 i NeIS2a. Najnovije istraživanje je pokazalo da vrste *N. cataria* i *N. mussinii* poseduju tri različita homologa gena koji kodiraju za *PRISE* enzime – IS (ovde obeležene kao *NmIS2* i *NcIS2*), $P5\beta R$ (ovde *NmIS1* i *NcIS1*) i intermedijernu sekvencu koja je nazvana sekundarna IS (*SISY*) (Lichman i sar., 2020). Sve tri sekvence su pronađene i kod *N. rtanjensis*, dok je intermedijerna

ovde označena kao *NrIS3*. Rekombinantni enzimi familije 2 su se pokazali kao aktivne izoforme, koje su vršile potpunu konverziju 8-oksogeraniala do *cis,trans*-nepetalaktola u esejima *in vitro* (*Sherden* i sar., 2017). Prema tome, rezultati filogenetske analize predviđali su da su *NrIS2* i *NsIS2a* aktivnije izoforme među izolovanim IS u ovoj disertaciji. Međutim, cilj ove doktorske disertacije nije bio analiza kinetike ovih enzima, pa treba imati u vidu da bi izmenjeni uslovi enzimskih reakcija mogli dovesti do različitih efikasnosti svih izoformi IS.

Kao što je već napomenuto, filogenetski odnosi gena kandidata za IS izolovanih u okviru ove disertacije pokazuju visok stepen homologije sa genima za *PRISE* iz različitih vrsta. Međutim, samo filogenetsko grupisanje ne predviđa sa sigurnošću katalitičku aktivnost enzima za koje izolovane nukleotidne sekvence kodiraju. Zbog toga je, nakon identifikacije kandidata za IS i izolacije pune dužine gena, analizirana njihova funkcija u enzimskim esejima *in vitro*, kojoj je prethodila heterologa ekspresija IS u *E. coli* i prečišćavanje rekombinantnih proteina. Rekombinantni enzimi su korišćeni u enzimskim esejima *in vitro* sa pretpostavljenim supstratom – 8-oksogeranialom, a strukturna karakterizacija ovih reakcija izvršena je pomoću *GC-MS* i NMR metode.

Nedavno je primećeno da proizvod reakcije, koju katalizuje IS *in vitro*, zavisi od koncentracije i pH vrednosti pufera (*Lichman* i sar., 2019a). Nakon što IS redukuje 8-oksogeranial, formira se aktivni intermedijer 8-oksocitronelil enol/enolat, koji napušta aktivno mesto enzima i prelazi u rastvarač. Sam pufer u kom se reakcija odvija može imati ulogu kiselog katalizatora i stimuliše tautomerizaciju. Kada je koncentracija MOPS pufera niska (<50 mM) odvijaju se dve ciklizacione reakcije i dominantno se generiše *cis,trans*-nepetalaktol. U umerenim koncentracijama pufera (50–500 mM) IS katalizuje ciklizaciju i keto-enol tautomerizaciju, pri čemu se formira monociklični *cis,trans*-iridodial. Direktna keto-enolna tautomerizacija se odvija u puferu sa visokom koncentracijom MOPS-a (>500 mM) i dominantno se proizvodi (*S*)-8-oksocitronelal. Takođe, uočeno je i da snižavanje pH vrednosti pufera ima isti efekat na ishod reakcije kao i visoka koncentracija pufera. U trenutku kada su vršeni eksperimenti *in vitro* enzimske karakterizacije rekombinantnih IS, samo je *cis,trans*-nepetalaktol bio dostupan kao standard od navedenih proizvoda reakcije. Zbog toga je korišćen pufer, koji je omogućavao najveći prinos *cis,trans*-nepetalaktola (*Lichman* i sar., 2019a), odnosno koncentracija MOPS-a je bila 50 mM, a pH vrednost je iznosila 7,5.

Nakon inkubiranja rekombinantnih IS sa pretpostavljenim supstratom 8-oksogeranialom i NADPH u reakcionom puferu (Materijal i metode odeljak 3.4.3.1.), produkti reakcija su analizirani pomoću *GC-MS*. Autentičnost standarda 8-oksogeraniala i *cis,trans*-nepetalaktola potvrđena je *GC-MS* analizom. Pikovi koji odgovaraju *cis,trans*-nepetalaktolu zapaženi su samo u reakcijama, koje su katalizovali rekombinantni *NrIS2*, *NsIS* i *NnIS*. Pokazano je da su IS iz *N. cataria* i *N. mussinii*, koje pripadaju familiji 1 (*NcIS1* i *NmIS1*), imale veoma nisku katalitičku aktivnost (*Sherden* i sar. 2017). Isti autori navode da je aktivnost ovih enzima veoma niska i da verovatno nisu fiziološki relevantni za biosintezu iridoida. U produktima enzimskih *in vitro* eseja sa *NrIS1* i *NpIS1a* nije detektovan *cis,trans*-nepetalaktol, što može objasniti njihova filogenetska srodnost sa sekvencama *NcIS1* i *NmIS1*. S druge strane, filogenetska analiza je izdvojila i *NsIS* i *NnIS*, kao sekvence bliske familiji 1 IS iz vrsta *Nepeta*, ali je potvrđeno da ove izoforme konvertuju 8-oksogeranial u *cis,trans*-nepetalaktol. NMR COSY spektar je pokazao da *NsIS* i *NnIS* ne dovode do potpune konverzije 8-oksogeraniala, što govori da ove dve izoforme ispoljavaju slabiju aktivnost od *NrIS2* u datim uslovima reakcije. Ne može se isključiti da bi izmenjeni uslovi reakcije (npr. pH vrednost pufera, koncentracija MOPS-a u puferu, temperatura, itd.) mogli dovesti do potpune konverzije i veće katalitičke aktivnosti *NsIS* i *NnIS*. Ranije istraživanje je utvrdilo da IS iz familije 2 vrsta *N. cataria* i *N. mussinii* (*NcIS2* i *NmIS2*) pokazuju visoke katalitičke aktivnosti, i da se time potvrđuje njihova uloga u biosintezi iridoida kod ovih vrsta (*Sherden* i sar., 2017). Filogenetska analiza je pokazala da je *NrIS2* veoma srodna sekvencama iz familije 2, dok su istovremeno *GC-MS* i NMR analiza pokazale da se supstrat potpuno konvertuje u *cis,trans*-nepetalaktol u reakciji

koju katalizuje ova izoforma IS. Pokazano je da aktivnost NcIS2 i NmIS2 dominantno dovodi do formiranja *cis,trans*-nepetalaktola, dok je *trans,cis*- izomer detektovan samo u tragovima, zbog čega su autori zaključili da u ovom koraku biosinteze nepetalaktona ne dolazi do produkcije različitih diastereoizomera (Sherden i sar., 2017). U eksperimentima sprovedenim u ovoj disertaciji nije bio dostupan standard *trans,cis*-nepetalaktola. Kao što je prethodno istaknuto, dosadašnja saznanja navode na pretpostavku da iridoid sintaze nisu odgovorne za formiranje različitih stereoizomera nepetalaktona, već ove varijacije generišu enzimi iz grupe NEPS (Lichman i sar., 2019a,b). Rezulti NMR analize potvrđuju da sve tri IS (NrIS, NsIS i NnIS), kojima je potvrđena funkcija u okviru ove disertacije, proizvode *cis,trans*-nepetalaktol, iako se finalni produkti biosinteze NL u ove tri vrste roda *Nepeta* razlikuju po stereoizohemiji.

Poravnanjem aminokiselinskih sekvenci je otkriveno prisustvo šest motiva, karakterističnih za P5 β R, u IS izolovanim iz vrsta roda *Nepeta* (Thorn i sar., 2008, Bauer i sar. 2010). Motiv I (GxTGIXG) intereaguje sa difosfatnom grupom NADP⁺ i za aktivnost ove sekvence su značajni glicini (G). Za motiv II (GxxRR) pokazano je da arginini (R) učestvuju u vezivanju atoma O-2' fosfata i prave razliku između NAD⁺ i NADP⁺. Motiv III (DxxD) selektivno intereaguje sa adeninskim prstenom NADP⁺. Motiv IV (TGxKHYxGP) sadrži lizin (K) značajan za katalitičku aktivnost enzima grupe *PRISE*. U okviru motiva V (NFYYxxED) nalazi se tirozinski ostatak (Y178), za koji je pokazano da obezbeđuje jedan od protona neophodnih za katalizu i da ima ključnu ulogu u aktivnim centrima kako P5 β R, tako i IS iz različitih vrsta (Thorn i sar., 2008, Hu i sar., 2015). Ovaj ostatak je konzerviran i prisutan u svim do sada poznatim sekvencama IS iz *Nepeta* (Sherden i sar, 2017). Motiv VI (WSVHRP) sadrži arginin (R) i prolin (P), koji jonskim interakcijama pozicioniraju katalitički značajne motive IV i V. Drugi značajan izvor protona je lizinski ostatak K146 iz motiva IV (TGxKHYxGP). Iako je K146 konzerviran u CrIS, pokazano je da nema esencijalnu ulogu u aktivnom mestu (Kries i sar. 2016, Hu i sar. 2015). Ovaj ostatak izostaje kod NrIS2 i zamenjen je fenilalaninom (F146), što je potvrđeno i kod NcIS2 i NmIS2 (Sherden i sar. 2017). S druge strane, K146 je prisutan kod NsIS, NnIS, kao i kod manje aktivne familije 1 IS iz *Nepeta*. Pokazano je da region Gly150-Asp160 kod CrIS omogućava konformacionu fleksibilnost aktivnog mesta (Kries i sar., 2016), koja je neophodna u koraku ciklizacije linearnog supstrata. Međutim, mutacije u ovom regionu prisutne kod familije 2 NIS (Sherden i sar., 2017), kao i kod NrIS2 evidentno ne menjaju katalitičku efikasnost ovih enzima. Izuzev kod AmIS, kod svih upoređenih iridoid sintaza nalazi se fenilalaninski ostatak F342, za koji je pokazano da je od ključne važnosti za enzimsku reakciju, tako da kod mutacije F342A dolazi do inhibiranja aktivnosti IS (Hu i sar., 2015). Pokazano je da mutacija A346I nema uticaja na aktivnost CrIS (Hu i sar., 2015), što je potvrđeno i kod NrIS2, NsIS i NnIS, koje imaju I346. Kada je izoleucin zamenjen valinom na poziciji 345 došlo je do povećanja *R*-stereoselektivnog proizvoda u reakciji sa AmIS (Kries i sar., 2017). Kod NsIS i NnIS uočava se I345, što bi moglo da potvrdi dominantnu produkciju *S*-konfiguracije *cis,trans*-nepetalaktona u reakciji. Kao i u sekvenci AmIS, kod svih do sada poznatih IS iz *Nepeta* uočava se N349. U aktivnim mestima, kao specifični aminokiselinski ostaci svih IS iz *Nepeta*, izdvajaju se S246 i I346. Na poziciji 149 kod NrIS2 i NsIS, kao i kod NmIS2 nalazi se hidrofobni valin (V), dok sekvenca NnIS sadrži polarni treonin (T). Poziciju, koja odgovara 352. ostatku kod CrIS, u sekvencama NrIS2 i NmIS2 zauzima arginin (R), dok je kod NsIS i NnIS, kao i kod manje aktivnih IS familije 1 iz *Nepeta*, na ovom mestu hidrofobni triptofan (W). Prethodna istraživanja pokazuju važnost Ala346-Ser354 domena u prepoznavanju 8-oksogeraniala za CrIS i ističu da izoleucin na 346. poziciji može sprečiti vezivanje linearnog supstrata (Kries i sar., 2016). Međutim, I346 je prisutan kod svih potvrđenih katalitički aktivnih izoformi IS iz *Nepeta*, uključujući i NrIS2, NsIS i NnIS. Buduće analize molekulske dinamične simulacije i molekuskog dokinga otkriće uloge ovih aminokiselinskih ostataka u katalitičkim aktivnostima enzima NrIS2, NsIS i NnIS.

5.3.2. Funkcionalno okarakterisani IS eksprimiraju se kod vrsta roda *Nepeta*, bez obzira da li one proizvode NL ili ne

Približno 50 porodica biljaka proizvodi veliki broj različitih iridoida, od kojih je nekoliko stotina u obliku glikozida (*Boros i Stermitz*, 1990). Neglikozidni iridoidi, iz biljaka i insekata, uključuju jedinjenje koje sadrži azot – aktinidin, kao i nepetalakton. Brojne studije hemosistematike porodice Lamiaceae su istakle da je rod *Nepeta* jedini u okviru velike potporodice Nepetoideae, koji proizvodi iridoide. Stereohemija iridoida iz *Nepeta* ima 8*S* orijentaciju, za razliku od drugih iridoida iz porodice Lamiaceae, čija je orijentacija 8*R*. Ova razlika ukazuje na jedinstvenu prirodu ciklizacije iridoida iz vrsta roda *Nepeta* (*Beran i sar.*, 2019). Metaboličko profilisanje vrsta porodica Lamiaceae je pokazalo da se iridoidi gube u potporodici Nepetoideae, da bi se ponovo pojavili u rodu *Nepeta* (*Boachon i sar.*, 2018). U okviru roda *Nepeta* posebno je interesantna vrsta *N. nervosa*, u čijim tkivima su iridoidi detektovani samo u tragovima (*Nestorović i sar.*, 2010, *Nestorović Živković i sar.*, 2012, *Mišić i sar.*, 2015). Malobrojne su vrste roda *Nepeta* kod kojih NL nije detektovan ili se proizvodi u tragovima (*Gkinis i sar.*, 2003). Nedavna sveobuhvatna studija je pokušala da rasvetli molekularnu osnovu gubitka i ponovnog uspostavljanja produkcije iridoida u okviru porodice Lamiaceae (*Boachon i sar.*, 2018). Klasterovano je 48 taksona ove porodice na osnovu nivoa transkripata ortogrupa gena iridoidnog biosintetskog puta. Cilj je bio da se detektuju geni biosinteze iridoida, čije je odsustvo ili prisustvo u transkriptomu, kao i nivo ekspresije, u korelaciji sa gubitkom ili ponovnim uspostavljanjem produkcije iridoida. Rezultati su izdvojili gene za GES, IS, 8HG0A i iridoid oksidazu (IO). Nedavna publikacija je utvrdila da je gubitak biosinteze iridoida uzrokovan gubitkom IS u potporodici Nepetoideae, dok je paralelna koevolucija novih enzima IS i NEPS zaslužna za ponovno uspostavljanje produkcije ovih jedinjenja kod vrsta roda *Nepeta* (*Lichman i sar.*, 2020).

Nasuprot primarnom metabolizmu, čiji su procesi usavršavanja trajali više miliona godina, specijalizovani metabolizam biljaka je u evolutivnom smislu „mlad”. Kako je životna sredina veoma promenljiva, ovi biosintetski putevi su prolazili kroz kontinuiranu selekciju da bi omogućili maksimalno prilagođavanje biljaka okruženju. Prema tome, specijalizovani metabolizam biljaka daje uvid u procese genske evolucije i diverzifikacije. Pretpostavlja se da enzimi i biosintetski putevi veoma retko nastaju *de novo*, već da proizilaze iz već postojećih puteva promenama u regulatornim ili protein-kodirajućim sekvencama gena jedne kopije (eng. *single-copy*) ili genskom duplikacijom i sledstvenom divergencijom kopija. Na ove procese dalje mogu uticati genetički drift i/ili selekcija prema specifičnim alelima, koji vode ka fiksiranju ovih alela u populacijama. Genska duplikacija je centralni genetički mehanizam za stvaranje novih enzima specijalizovanog metabolizma. Iako se većina ovako nastalih gena vremenom gubi (*Moghe i Shiu*, 2014), neki mogu biti selektivno zadržani preko kodirajuće sekvence i/ili regulatorne evolucije zbog potrebe za enzimima sa novim korisnim funkcijama (neofunkcionalizacija) ili zbog podele predačke funkcije između genskog para nastalog duplikacijom (subfunkcionalizacija) (*Prince i Pickett*, 2002). Primeri zadržavanja gena nastalih duplikacijom su pojedini enzimi specijalizovanog metabolizma, kao što su terpen sintaze (*Falara i sar.*, 2011), halkan sintaze/poliketid sintaze (*Austin i Noel*, 2003) i acetil-transferaze (*D'Auria*, 2006), koji su članovi multigenskih porodica gena. Poseban primer predstavlja porodica citohrom P450 gena, za koju se procenjuje da sadrži i do 1% svih gena kod mnogih biljnih vrsta (*Mizutani i Ohta*, 2010). Ovakvo proširenje genskih familija stvara plodno tlo za evoluciju novih metaboličkih aktivnosti, ili u okviru istog enzima ili između gena duplikata (*Weng i sar.*, 2012).

Od velikog značaja za specijalizovani metabolizam su enzimi koji se odlikuju niskom specifičnošću prema supstratu i reakciji, tzv. promiskuitetni enzimi. Pretpostavlja se da ovakvi enzimi doprinose evoluciji biosintetskih puteva, jer je manji broj mutacija neophodan za stvaranje novih funkcija kada se počinje sa fleksibilnom matricom, nego kada je u pitanju optimizovani enzim visoke specifičnosti (*Atkins*, 2015). Promiskuitet enzima ne mora uvek biti aktivan u organizmu, već se može javljati samo u

specifičnim uslovima – tzv. „podzemni” ili „tihu” metabolizam (eng. „*underground*“ ili „*silent metabolism*“) (Kreis i Munkert, 2019). Prema Hultu i Berglundu (2007) razlikuju se tri tipa promiskuitetnosti enzima: a) u odnosu na uslove reakcije, b) u odnosu na supstrat i c) katalitički promiskuitet. Promiskuitetnost u odnosu na uslove reakcije pokazuju enzimi kojima katalitička aktivnost odstupa od one koja se javlja u prirodnim uslovima, kao što su anhidrovana sredina, ekstremna temperatura ili pH. Promiskuitetnost u odnosu na supstrat podrazumeva da ovakvi enzimi imaju široku specifičnost prema supstratu. Katalitički promiskuitet se odnosi na sposobnost aktivnog mesta enzima da katalizuje više različitih hemijskih transformacija. Kada je katalitički promiskuitet rezultat mutacionih promena i genske duplikacije može se desiti da enzim stekne novu funkciju u metabolizmu, a da pri tome ne izgubi originalnu. Mnogi enzimi ispoljavaju više od jednog tipa promiskuiteta. Interesantan primer ovakvih enzima od interesa su za ovu disertaciju i pripadaju grupi *PRISE*. Geni koji kodiraju za *PRISE* grupu enzima detektovani su u transkriptomima velikog broja cvetnica (Bauer i sar., 2010, Munkert i sar., 2015a,b). Zbog različitih funkcija koje obavljaju, ovi enzimi se nazivaju još i progesteron-5 β -reduktazama (Herl i sar., 2006a,b), 3-okso- $\Delta^{4,5}$ -steroid 5 β -reduktazama (Herl i sar., 2009) ili iridoid sintazama (Geu-Flores i sar., 2012). Enzimi grupe *PRISE* mogu da redukuju dvostruku vezu C=C progesterona u biosintezi kardenolida i/ili da katalizuju redukciju 8-oksogeraniala i generišu iridoidni prsten, koji je gradivna jedinica svih iridoida. Do sada nisu pronađeni strukturni markeri koji bi sa sigurnošću mogli da razlikuju enzime sa aktivnošću iridoid sintaza od onih sa funkcijom progesteron-5 β -reduktaza. U enzimskim esejima *in vitro*, pokazano je da *PRISE* mogu da konvertuju 8-oksogeranial i/ili progesteron-5 β -reduktazu, bez obzira na to da li su izolovani iz vrsta koje produkuju kardenolide ili iridoide, ili ne sintetišu nijedno od ovih jedinjenja. Poznato je da ovi enzimi mogu da koriste kao supstrate i reaktivne elektrofilne vrste – 1,4-enone, kao što su 2-cikloheksen-1-on, metil vinil keton ili citral (Burda i sar., 2009). Pretpostavlja se da je glavna fiziološka uloga ovih enzima univerzalna, kao što je deaktivacija α,β -nezasićenih ketona nastalih pod uticajem stresogenih faktora, a da njihov katalitički promiskuitet nije indukovano, već je nastao slučajno i selektivno je zadržan da bi postali deo 5 β -kardenolidnog i iridoidnog biosintetskog puta (Schmidt i sar., 2018).

Kao što je očekivano, dominantni iridoidni metaboliti u korenu, stablu i listovima *N. rtanjensis* su *trans,cis*-NL, DNL i *eDLA*. Obrasci nivoa ekspresije *NrIS2* prate količinu sadržaja ovih jedinjenja u različitim organima *N. rtanjensis*. Zajedno sa *in vitro* karakterizacijom, ko-ekspresijom ovog gena sa drugim genima biosintetskog puta u trihomima, kao i u listovima *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* tokom dehidracije, ovo je još jedan u nizu rezultata iz ove disertacije koji potvrđuju ulogu *NrIS2* u metabolizmu nepetalaktona. Takođe, funkcija *NsIS* je dodatno potvrđena rezultatima ovog eksperimenta. Zapaža se da obrasci ekspresije gena *NsIS* odgovaraju sadržaju dominantnih iridoida u različitim organima *N. sibirica*. U listovima *N. sibirica* se dominantno proizvodi *cis,trans*- izomer NL, kao i *eDLA2*, dok je DNL detektovan samo u tragovima. Ovo je u skladu sa rezultatima ranijih publikacija (Mišić i sar., 2015, Nestorović Živković i sar., 2010). U literaturi se navodi da obrasci ekspresija gena za funkcionalno okarakterisane IS iz različitih vrsta prate sadržaje dominantnih iridoida. Pokazano je da su nivoi ekspresije gena *OeIS* u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem sekoiridoida u listovima i cvetovima vrste *O. europea* (Alagna i sar., 2016). Takođe, ekspresija funkcionalno okarakterisanog gena *AmIS* najviša je u listovima vrste *A. majus*, u kojima se antirinozid sintetiše i odatle distribuira u druga tkiva (Kries i sar., 2017). Kod *Swertia mussotti* zapaženo je da nivoi ekspresije *SmIS1* i *SmIS2* pokazuju isti trend kao i sadržaj sekoiridoida u stablima i listovima (Xiang i sar., 2017). Takođe, pokazano je da samo ekspresija gena *CrIS* prati sadržaj MIA u *C. roseus*, dok geni za druge enzime iz grupe *PRISE* nemaju isti obrazac ekspresije (Munkert i sar., 2015, Kidd i sar. 2019). Iako je potvrđeno u enzimskim esejima *in vitro* da *NnIS* konvertuje 8-oksogeranial do *cis,trans*-nepetalaktola, budući da *N. nervosa* ne proizvodi iridoide, ili ih proizvodi samo u tragovima, moglo bi se pretpostaviti da ovaj enzim ima neku drugu funkciju u tkivima ove vrste. Apsolutna kvantifikacija genske ekspresije je ukazala na prisustvo velikog broja kopija gena *NnIS* u stablu i listovima *N. nervosa*. Ovi rezultati nisu u skladu sa

ranijim istraživanjem, koje navodi da se visok nivo transkripata IS značajno više javlja kod vrsta porodice Lamiaceae koje akumuliraju iridoide (*Boachon i sar.*, 2018). Zbog toga se može pretpostaviti da je *N. nervosa* verovatno nedavno u evoluciji izgubila sposobnost sinteze ovih jedinjenja, a da je uzrok tome izostanak ekspresije ili gubitak funkcije/aktivnosti nekog drugog gena, a ne IS. Slično je primećeno i kod vrste *Petraeovites bambusetorum* (*Boachon i sar.*, 2018).

5.4. Biološke aktivnosti metanolnih ekstrakata i dominantnih iridoidnih i fenolnih jedinjenja listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*

5.4.1. Antimikrobno dejstvo

Antibiotici, koji su zaslužni za revolucionarni razvoj medicine 20. veka, i danas imaju centralnu ulogu u lečenju infektivnih bolesti. Međutim, neadekvatna i iracionalna upotreba ovih lekova dovela je do pojave antimikrobne rezistencije. Multirezistentne patogene bakterije predstavljaju jedan od gorućih problema savremenog društva koji ugrožava sve aspekte moderne medicine i pravi ogromnu štetu svetskoj ekonomiji. Procenjuje se da će do 2050. godine antimikrobna rezistencija uzrokovati gubitak od 10 miliona života godišnje, dok će troškovi borbe protiv ove pojave iznositi 100 biliona dolara (*O'Neill i sar.*, 2016, *De Kraker i sar.*, 2016). U poslednje dve decenije ostvaren je značajan napredak u otkrivanju novih antimikrobnih terapeutika, koji uglavnom vode poreklo iz biljaka (*Anand i sar.*, 2019). Uvećava se potreba za primenom prirodnih antimikrobnih jedinjenja i u prehrambenoj industriji. Do sada je industrija hrane masovno koristila hemijske konzervanse koji su dugoročno povezani sa brojnim zdravstvenim rizicima, uključujući i stimulisanje razvoja različitih autoimunih bolesti. Zbog toga, savremeni trendovi u prehrambenoj tehnologiji su fokusirani na upotrebu prirodnih jedinjenja koja se smatraju bezbednim alternativama i zadovoljavaju želje potrošača za ekološkom hranom (*Bondi i sar.*, 2017). Brojne studije prikazuju obećavajuće rezultate, kada su u pitanju antimikrobna svojstva biljnih etarskih ulja i ekstrakata u prehrambenim proizvodima (*Solórzano-Santos i Miranda-Navales*, 2012).

U ovoj disertaciji testirana je antimikrobna aktivnost ekstrakata *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*, kao i dominantnih iridoidnih i fenolnih jedinjenja ovih biljaka na osam vrsta bakterija (*B. cereus*, *S. aureus*, *M. flavus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* i *S. typhimurium*) i sedam vrsta gljiva (*A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. niger*, *P. funiculosum*, *P. ochlochloron* i *P. v. cylopium*). Sve navedene vrste mikroba su patogeni koji se razvijaju u prehrambenim proizvodima, i mogu dovesti do ozbiljnih infekcija i bolesti ljudi konzumiranjem kontaminirane vode i termički neobrađene hrane (*Priyanka i sar.*, 2016). Gram-pozitivni *Bacillus cereus* može proizvoditi dva različita toksina –dijaretički, koji izaziva dijareju i termostabilni emetički, koji izaziva povraćanje. U dezertima, mesu i mlečnim proizvodima se najčešće razvija dijaretički oblik bolesti, dok je pirinač uobičajeno mesto razvoja emetičke bolesti (*Griffiths i Schraft*, 2017). Glavni rezervoari *Staphylococcus aureus* su nos, grlo i koža ljudi i životinja, ali se ove bakterije mogu naći i u vazduhu, prašini, kanalizaciji i vodi (*Behling i sar.*, 2010). *S. aureus* su otporne na dehidrataciju i visoke koncentracije soli (*Seo i Bohach*, 2007), dok vrste roda *Micrococcus* ispoljavaju slabu i ograničenu patogenost, a uobičajeno stanište im je koža sisara, kao i meso i mlečni proizvodi (*Smith i sar.*, 1999). *Listeria monocytogenes* je izazivač bolesti poznate kao listerioza, koja uzrokuje veću stopu smrtnosti nego druge patogene bakterije i posebno je opasna za trudnice i osobe sa oslabljenim imunitetom (*Yeni i sar.*, 2016). Nedavno je izbio njen razvoj u mesnim prerađevinama, mleku i proizvodima od ribe u razvijenim zemljama, poput Francuske i SAD (*Yeni i sar.*, 2016). Poznato je da je ovaj patogen veoma otporan na visoke koncentracije soli, pasterizaciju i niske temperature (*Oliver i sar.*, 2005). Vrste roda *Enterococcus* se često mogu naći u mlečnim i drugim prehrambenim proizvodima, pri čemu se pokazalo da mogu ispoljavati patogena, ali i neka povoljna svojstva, kao što je produkcija bakteriocina (*Giraffa i sar.*, 1997). *Pseudomonas aeruginosa* je jedan od vodećih bolničkih patogena u odeljenjima intenzivne nege, a može biti i uzročnik kvarenja hrane

(*Restaino i sar., 1995*). *E.coli* je deo normalne bakterijske crevne flore, dok su neki sojevi ove vrste patogeni i mogu izazvati različite bolesti uključujući dijareju i hemolitički uremijski sindrom (*Belongia i sar., 1991*). *Salmonella typhimurium* je poznata kao patogen koji nastanjuje prvenstveno jaja i termičke neobrađene proizvode od jaja. Vrste roda *Salmonella* mogu da izazovu dva tipa bolesti–gastrointestinalnu salmonelozu, koja ima blaže simptome i tifoidnu groznicu, koja daje mnogo ozbiljnije simptome (*Tauxe i sar., 1991*).

Mikotoksini su specijalizovani metaboliti gljiva, koji mogu dovesti do različitih zdravstvenih problema ljudi, od blažih kao što su gastrointestinalni problemi do ozbiljnih poput karcinoma. Samo prisustvo mikromiceta u prehrambenim proizvodima neće rezultovati kontaminacijom mikotoksinima, već se njihova formacija može podstaći određenim sredinskim faktorima (*Drusch i Ragab, 2003*). Primera radi, ako se jezgrovo voće i uljane semenke ne čuvaju na odgovarajućim temperaturama, na kojima se održava adekvatni sadržaj vode u ovim proizvodima, može se aktivirati specijalizovani metabolizam gljiva (*Adams i Moss, 2000*). Aflatoksin je veoma toksičan i produkuje ga neki sojevi *A. flavus*. Ohratoksin i citrinin su nefrotoksini i sintetišu ga *Aspergillus ochraceus* i *Penicillium verrucosum*. Patulin proizvode neki sojevi *Penicillium* i *Aspergillus*, a naročito u voću i u uljanim semenkama (*Adams i Moss, 2000*).

Veliki broj prethodnih studija ukazao je na snažno antimikrobno dejstvo etarskih ulja i metanolnih ekstrakata vrsta roda *Nepeta*, koje se uglavnom pripisuje nepetalaktonima. U ranijim istraživanjima je pokazano da etarsko ulje *N. rтанjensis* ispoljava jako antibakterijsko dejstvo na *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli*, *S. aureus* i *Aspergillus niger*, dok su najosetljivije mikromicete dve vrste *Alternaria*, kao i *Cladosporium cladosporoides*, *Trichoderma viride* i *Bipolaris spicifera* (MIC 0,6 do 1,4 mg/ml) (*Stojanović i sar., 2005*). Najnižu rezistentnost na etarsko ulje *N. sibthorpii* (sinonim *N. argolica* subsp. *argolica*), veoma bogato *cis,trans*-NL (83,1–94,5%), pokazale su vrste *S. aureus* i *A. niger* (*Galati i sar., 2006*). Pored toga, metanolni ekstrakt *N. rтанjensis*, koji je dominantno sadržao *trans,cis*-NL, pokazivao je značajnu antibakterijsku aktivnost (MIC 50 µg/ml) prema svih osam testiranih bakterijskih sojeva (*Nestorović i sar., 2010*). U istom radu ekstrakt *N. rтанjensis* pokazao je približno deset do trideset puta jače antifungalno dejstvo od komercijalnog antifungalnog agensa na osam vrsta gljiva. Analizirani su i ekstrakt *N. sibirica*, u kom je najzastupljenije jedinjenje bilo *cis,trans*-NL, kao i *N. nervosa*, u kom NL nije detektovan, i ekstrakti obe vrste su pokazali snažno antimikrobno dejstvo (*Nestorović i sar., 2010*). U ovom istraživanju detektovano je da je epideoksiloganinska kiselina (eDLA) dominantan iridoid metanolnih ekstrakata *N. rтанjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*, dok se njihov sastav kvalitativno razlikuje na nivou iridoidnih aglikona. U metanolnim ekstraktima *N. rтанjensis* zastupljeni su *trans,cis*-NL i DNL, dok ekstrakt *N. argolica* subsp. *argolica* karakteriše prisustvo *cis,trans*-NL. Prethodna istraživanja su pokazala da je dominantno fenolno jedinjenje mnogih vrsta roda *Nepeta* ruzmarinska kiselina (RA) i ovom jedinjenju je pripisano snažno antioksidativno dejstvo ekstrakata vrsta ovog roda (*Cvetković i sar., 2015*, *Nestorović Živković i sar., 2018*). Prema tome, antimikrobno dejstvo vrsta roda *Nepeta* analiziranih u ovoj disertaciji mogu se pripisati visokom sadržaju iridoida, na prvom mestu epideoksiloganinske kiseline, nepetalaktona i dehidronepetalaktona, kao i prisustvu fenolnih jedinjenja kao što su ruzmarinska i hlorogena kiselina. Međutim, ne treba zanemariti efekat jedinjenja koja su prisutna u nižim koncentracijama, a koja, u sinergizmu sa dominantnim jedinjenjima, mogu bitno uticati na bioaktivnost.

U skladu sa prethodnim istraživanjima, rezultati u ovoj disertaciji prikazuju da ekstrakti listova *N. rтанjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* ispoljavaju antimikrobnu aktivnost na svim testiranim vrstama bakterija i gljiva. Naročito snažno dejstvo su pokazali ekstrakti ove dve vrste na analizirane mikromicete, dok je antibakterijsko dejstvo bilo oko dva puta slabije u odnosu na streptomycin, što podržava rezultate koje su dobili *Nestorović i sar. (2010)*. Kako bi se ustanovilo koje dominantno iridoidno ili fenolno jedinjenje je zaduženo za antimikrobno dejstvo ekstrakata *N. rтанjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*,

upoređeni su njihovi antimikrobni efekti na navedenih osam vrsta bakterija i sedam vrsta gljiva. Rezultati pokazuju da sva čista jedinjenja imaju veoma snažno antimikrobno dejstvo na sve testirane vrste, kao i da je njihovo dejstvo nekoliko puta jače od komercijalnog antibiotika i antimikotika. Interesantno je da Nestorović i saradnici (2010.) nisu zabeležili efekte ekstrakta *N. sibirica* na sojeve vrsta *L. monocytogenes* i *S. typhimurium*, dok čist *cis,trans*-NL ima 80 puta jače antibakterijsko dejstvo na ove vrste u odnosu na streptomycin. Može se pretpostaviti da je razlog za ovu pojavu antagonistički efekat između *cis,trans*-NL i jedinjenja koja su manje zastupljena u ekstraktima *N. sibirica*. Takođe, ovo bi moglo biti i objašnjenje rezultata dobijenih u ovoj disertaciji, u kojima čista jedinjenja imaju nekoliko puta snažnije antimikrobno dejstvo od ekstrakata biljaka u kojima su dominantno zastupljena. Ranije studije ukazuju na snažnije biološke aktivnosti stereoizomera *trans,cis*-NL u odnosu na *cis,trans*-NL (Dawson i sar., 1996, Hardie i sar., 1997, Bates i sar., 1963, Gkinis i sar., 2003, Peterson i sar., 2001, Peterson i sar., 2002), što je u skladu sa rezultatima antifungalne aktivnosti u ovoj disertaciji. *Trans,cis*-NL ispoljava izraženiji antifungalni efekat na *A. ochraceus*, *A. verrucosum* i *A. funiculosum* u odnosu na *cis,trans*-NL. Očekivan je rezultat koji prikazuje da ispitano fenolno jedinjenje (RA) ima snažno antimikrobno dejstvo, s obzirom na to da je isto dejstvo prikazao ekstrakt *N. nervosa*, koji ne sadrži iridoide, već samo RA (Nestorović i sar., 2010).

5.4.2. Imunomodulacijsko dejstvo

Makrofagi formiraju prvu barijeru odbrambenog sistema organizma i obično proizvode i sekretuju neke pro-inflamatorne citokine, kao što su faktor nekroze tumora (*TNF- α*) i interleukini (*IL*), koji se koriste u determinaciji imunog odgovora. Tokom inflamatornog procesa ćelije imunog sistema oslobađaju medijatore kao što su *TNF*, citokini, reaktivne kiseonične vrste (*ROS*) i NO. Ovi medijatori igraju važnu ulogu u progresiji inflamacije, zbog čega mogu podstaći razvoj različitih inflamatornih i autoimunih bolesti, kao što su reumatoidni artritis, psorijaza, arteroskleroza, dijabetes tipa 2 i Alchajmerova bolest. Prikazani rezultati ukazuju na to da ekstrakti listova *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*, kao i *trans,cis*-NL i *cis,trans*-NL, nemaju uticaja na aktivacioni status makrofaga. Prethodna studija je čak pokazala snažan anti-inflamatorni efekat metanolnog ekstrakta *N. argolica* subsp. *argolica* (Miceli i sar., 2005). Za ekstrakte *N. dschuparensis* pokazano je da značajno snižavaju nivoe proinflatornih citokina *IL-1 β* i *COX-2* (Nia i sar., 2017).

Usled visoke antimikrobne aktivnosti, metanolni ekstrakti *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica* se mogu preporučiti za konzerviranje hrane i lečenje intestinalnih oboljenja nastalih kao posledica različitih bakterijskih i gljivičnih infekcija. Kao naročito snažni antimikrobni agensi su se pokazala čista dominantna iridoidna jedinjenja (*trans,cis*-NL, *cis,trans*-NL, *eDLA* i *DNL*) i fenolno jedinjenje (RA), koji imaju i do nekoliko desetina puta jače antimikrobno dejstvo u odnosu na komercijalni antibiotik i antimikotik.

6. Zaključci

1. Glandularni trihomi na listovima *Nepeta rtanjensis* Diklić i Milojević, koji se odlikuju visokim sadržajem nepetalaktona (NL), i koji su izrazito bogati transkriptima 10 gena kandidata biosintetskog puta nepetalaktona (*GPPS*, *GES*, *G8O*, *8HGO*, *IS1*, *IS2*, *NEPS1a*, *NEPS1b*, *NEPS2* i *NEPS3*) i gena 4 transkripciona faktora (*CO11*, *JAZ3*, *MYC2* i *YABBY5*), predstavljaju glavno mesto biosinteze i akumulacije ovog iridoida.
2. Metabolizam NL je regulisan tokom procesa razvića listova *N. rtanjensis*, što pokazuju sinhronizovani obrasci ekspresije gena koji kodiraju iridoid sintazu (*NrIS1*) i sadržaja dominantnih nepetalaktona, pri čemu se metabolička aktivnost snižava sa starošću listova.
3. Dehidratacija izazvana PEG-om dovodi do značajnih promena u metabolizmu nepetalaktona u listovima, koje se ogledaju u koordinisanom sniženju ekspresije većine gena kandidata koji kodiraju za enzime biosintetskog puta NL i za transkripcione faktore, što dovodi do redukovanog fluksa kroz biosintetski put i inicijalnog sniženja sadržaja NL.
4. *N. argolica* subsp. *argolica*, a naročito *N. rtanjensis*, razvile su mehanizme koji tokom nepovoljnih uslova dehidratacije održavaju esencijalne fiziološke procese i racionalizuju svoj specijalizovani metabolizam tako da čuvaju sadržaj nepetalaktona u tkivima. Ove dve vrste se usled toga mogu preporučiti kao pogodne za gajenje u aridnim i polu-aridnim područjima.
5. Transkripcioni faktori *MYC2* i *YABBY5* prepoznati su kao pozitivni regulatori biosinteze NL u uslovima dehidratacije kod analiziranih vrsta roda *Nepeta*.
6. Heterologom ekspresijom u *E. coli*, prečišćavanjem rekombinantnih proteina i analizom njihove aktivnosti u enzimatskim *in vitro* esejima, funkcionalno su okarakterisane iridoid sintaze iz dve vrste roda *Nepeta* koje proizvode NL, *N. rtanjensis* (*NrIS2*) i *N. sibirica* (*NsIS*), kao i iz vrste *N. nervosa* (*NnIS*) koja je karakteristična po tome što ne proizvodi NL. Homolozi *NrIS2* iz *N. rtanjensis* zabeleženi su i u vrstama *N. argolica* subsp. *argolica*, *N. parnassica* i *N. ernesti-mayeri*, što potvrđuje njihovu filogenetsku bliskost.
7. Broj transkriptata funkcionalno okarakterisanih iridoid sintaza *N. rtanjensis* (*NrIS2*) i *N. sibirica* (*NsIS*) prati obrazac koncentracija dominantnih iridoida u različitim organima (koren<stablo<listovi). Gradijent sadržaja nepetalaktona u različitim organima očigledno je uslovljen njihovom biosintetskom aktivnošću, a verovatno i brojnošću i tipovima glandularnih trihoma, koje predstavljaju glavno mesto akumulacije iridoida.
8. Činjenica da se funkcionalne iridoid sintaze ekspimiraju kod *N. nervosa* (*NnIS*), vrste koja ne proizvodi iridoide, ukazuje na prisutvo biosintetske platforme za proizvodnju nepetalaktona, koja je neaktivna. Najverovatniji evolutivni scenario podrazumeva gubitak sposobnosti biosinteze iridoida usled „gašenja” ili „stišavanja” funkcije nekog gena uzvodno u biosintetskom putu. Vrsta *N. nervosa* je usled toga interesantan model sistem za primenu metaboličkog inženjeringa u cilju produkcije željenih stereoizomera nepetalaktona i drugih iridoida.
9. Primenom metaboličkog inženjeringa, koji bi uključio pojačanu ekspresiju nekih od ključnih gena biosintetskog puta nepetalaktona ili gena za transkripcione faktore *MYC2* i *YABBY5*, može se u budućnosti obezbediti održiva proizvodnja nepetalaktona i njegovih derivata iz alternativnih izvora, u homologim ili heterologim domaćinima. Ovakvim pristupom se istovremeno može smanjiti pritisak na prirodne resurse, što sa stanovišta konzervacione biologije ima veliki značaj u očuvanju endemičnih i ugroženih vrsta roda *Nepeta*.
10. Stereozomeri nepetalaktona i njihovi derivati, pojedinačno, ili u kompleksnim smešama kao što su metanolni ekstrakti *N. rtanjensis* i *N. argolica* subsp. *argolica*, pokazuju snažnu antibakterijsku i antifungalnu aktivnost, i mogu se preporučiti kao efikasni antimikrobni agensi.

7. Literatura

- Adams, M.R., Moss, M.O., 2000. Bacterial agents of foodborne illness. In: Food microbiology, 184-271.
- Adiguzel, A., Ozer, H., Sokmen, M., Gulluce, M., Sokmen, A., Kilic, H., Sahin, F., Baris, O., 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Nepeta cataria*. Polish Journal of Microbiology, 58(1), 69-76.
- Agarwal, O.P., Khanna D. S., Arora, R.B., 1978. Studies of the antiatherosclerotic action of *Nepeta hindostana* in pigs. Artery 4, 487.
- Agarwal, U.P., 1999. An overview of Raman spectroscopy as applied to lignocellulosic materials. Adv. Lignocellul. Charact. 201-225.
- Alagna, F., Geu-flores, F., Kries, H., Panara, F., Baldoni, L., Connor, S.E.O., Osbourn, A., 2016. Identification and characterization of the iridoid synthase involved in oleuropein biosynthesis in olive (*Olea europaea*) fruits. Am. Soc. Biochem. Mol. Biol. 291, 5542-5554.
- Alford, R.F., Leaver-Fay, A., Jeliakov, J.R., O'Meara, M.J., DiMaio, F.P., Park, H., Shapovalov, M.V., Renfrew, P.D., Mulligan, V.K., Kappel, K., Labonte, J.W., 2017. The Rosetta all-atom energy function for macromolecular modeling and design. Journal of chemical theory and computation, 13(6), 3031-3048.
- Ali, T., Javan, M., Sonboli, A., Semnani, S., 2012. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the essential oil of *Nepeta crispa* Willd. in experimental rat models. Nat. Prod. Res. 26, 1529-1534.
- Ambrosio, S.R., Oki, Y., Heleno, V.C.G., Chaves, J.S., Nascimento, P.G.B.D., Lichston, J.E., Constantino, M.G., Varanda, E.M., Costa, F.B. Da, 2008. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: Relationships to herbivory and antifeedant activity. Phytochemistry 69, 2052-2060. doi:10.1016/j.phytochem.2008.03.019
- Amer, A. i Mehlhorn, H., 2006. The sensilla of *Aedes* and *Anopheles* mosquitoes and their importance in repellency. Parasitology research, 99(4), 491-499.
- Amist, N.A., Singh, N.B.S., 2016. PEG imposed water deficit and physiological alterations in hydroponic cabbage. Plant Physiology, 6(2), 1651-1658.
- Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A., Lakhssassi, N., 2019. A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. Metabolites, 9 (11), 258.
- Aničić, N., Matekalo, D., Skorić, M., Pećinar, I., Brkušanić, M., Nestorović Živković, J., Dmitrović, S., Dajić Stevanović, Z., Schulz, H., Mišić, D., 2018. Trichome-specific and developmentally regulated biosynthesis of nepetalactones in leaves of cultivated *Nepeta rtanjensis* plants. Ind. Crops Prod. 117, 347-358.
- Arimura, G.I., Maffei, M. eds., 2016. Plant Specialized Metabolism: Genomics, Biochemistry, and Biological Functions. CRC Press.
- Ascensão, L., Marques, N., Pais, M.S., 1995. Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). Annals of Botany, 75(6), 619-626.
- Ashton, M.; Moloney, B., 2007. Solution phase parallel chemistry. In: Comprehensive Medicinal

Chemistry II; Elsevier: Oxford, 61–790.

- Atkins, W.M., 2015. Biological messiness vs. biological genius: mechanistic aspects and roles of protein promiscuity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 151, 3-11.
- Austin, M.B., Noel, J.P., 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural product reports*, 20(1), 79-110.
- Aydin, S., Beis, R., Öztürk, Y., Hüsni, K., Baser, C., 1998. Nepetalactone: a new opioid analgesic from *Nepeta caesarea* Boiss. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(7), 813-817.
- Baher, Z.F., Mirza, M., Ghorbanli, M., Bagher Rezaii, M., 2002. The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(4), 275-277.
- Bahreinejad, B., Razmjoo, J., Mirza, M., 2014. Effect of water stress on productivity and essential oil content and composition of *Thymus carmanicus*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(5), 717-725.
- Balcke, G.U., Bennewitz, S., Bergau, N., Athmer, B., Henning, A., Majovsky, P., Jiménez-Gómez, J.M., Hoehenwarter, W., Tissier, A., 2017. Multi-omics of tomato glandular trichomes reveals distinct features of central carbon metabolism supporting high productivity of specialized metabolites. *The Plant Cell*, 29(5), 960-983.
- Ball, P. W., Getliffe, F., 1972. In: *Flora Europaea* (Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M. and Webb, D. A., eds) Vol. 3, Cambridge University Press, 166.
- Barbieri, G., Vallone, S., Orsini, F., Paradiso, R., De Pascale, S., Negre-Zakharov, F., Maggio, A., 2012. Stomatal density and metabolic determinants mediate salt stress adaptation and water use efficiency in basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Plant Physiol.* 169, 1737–1746. doi:10.1016/j.jplph.2012.07.001
- Bates, R.B., Eisenbraun, E.J., McElvain, S.M., 1958. The Configurations of the Nepetalactones and Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 3420–3424.
- Bauer, P., Munkert, J., Brydziun, M., Burda, E., Müller-Uri, F., Gröger, H., Muller, Y.A., Kreis, W., 2010. Highly conserved progesterone 5 β -reductase genes (P5 β R) from 5 β -cardenolide-free and 5 β -cardenolide-producing angiosperms. *Phytochemistry*, 71(13), 1495-1505.
- Behling, R.G., Eifert, J., Erickson, M.C., Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., Line, E., Radcliff, R., Ryser, E.T., Stawick, B. and Yan, Z., 2010. Selected pathogens of concern to industrial food processors: infectious, toxigenic, toxico-infectious, selected emerging pathogenic bacteria. In: *Principles of microbiological troubleshooting in the industrial food processing environment*. Springer, New York, NY, 5-61
- Belongia, E.A., MacDonald, K.L., Parham, G.L., White, K.E., Korlath, J.A., Lobato, M.N., Strand, S.M., Casale, K.A. and Osterholm, M.T., 1991. An outbreak of *Escherichia coli* 0157: H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. *Journal of infectious diseases*, 164(2), 338-343.
- Beran, F., Köllner, T.G., Gershenzon, J., Tholl, D., 2019. Chemical convergence between plants and insects: biosynthetic origins and functions of common secondary metabolites. *New Phytologist*, 223(1), 52-67.
- Bergau, N., Bennewitz, S., Syrowatka, F., Hause, G. and Tissier, A., 2015. The development of type VI glandular trichomes in the cultivated tomato *Solanum lycopersicum* and a related wild species *S. habrochaites*. *BMC Plant Biology*, 15(1), 289.

- Bicchi, C., Mashaly, M., Sandra, P., 1984. Constituents of Essential Oil of *Nepeta nepetella*. *Planta Med.* 50, 96–98.
- Bickford, C.P., 2016. Ecophysiology of leaf trichomes. *Functional Plant Biology*, 43(9), 807-814.
- Billingsley, J.M., DeNicola, A.B., Barber, J.S., Tang, M.C., Horecka, J., Chu, A., Garg, N.K., Tang, Y., 2017. Engineering the biocatalytic selectivity of iridoid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering*, 44, 117-125.
- Billingsley, J.M., Anguiano, J.L., Tang, Y., 2019. Production of semi-biosynthetic nepetalactone in yeast. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 46(9-10), 1365-1370.
- Birkett, M.A., Hassanali, A., Hoglund, S., Pettersson, J., Pickett, J.A., 2011. Repellent activity of catmint, *Nepeta cataria*, and iridoid nepetalactone isomers against Afro-tropical mosquitoes, ixodid ticks and red poultry mites. *Phytochemistry*, 72(1), 109-114.
- Birkett, M.A. and Pickett, J.A., 2003. Aphid sex pheromones: from discovery to commercial production. *Phytochemistry*, 62(5), 651-656.
- Bisio, A., Corallo, A., Gastaldo, P., Romussi, G., Ciarallo, G., Fontana, N., De Tommasi, N., Profumo, P., 1998. Glandular hairs and secreted material in *Salvia blepharophylla* Brandegees ex Epling grown in Italy. *Ann. Bot.* 83, 441–452.
- Blaženčić, J., Randelović, V., Butorac, B., Vukojičić, S., Zlatković, B., Žukovec, D., Čalić, I., Pavićević, D., Lakušić, D., 2005. Staništa Srbije—Priručnik sa opisima i osnovnim podacima. Institut za Botaniku i Botanička Bašta “Jevremovac”, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Boachon, B., Buell, C.R., Crisovan, E., Dudareva, N., Garcia, N., Godden, G., Henry, L., Kamileen, M.O., Kates, H.R., Kilgore, M.B., Lichman, B.R., Mavrodiev, E. V., Newton, L., Rodriguez-Lopez, C., O’Connor, S.E., Soltis, D., Soltis, P., Vaillancourt, B., Wiegert-Rininger, K., Zhao, D., 2018. Phylogenomic Mining of the Mints Reveals Multiple Mechanisms Contributing to the Evolution of Chemical Diversity in Lamiaceae. *Mol. Plant* 11, 1084–1096. doi.org/10.1016/j.molp.2018.06.002
- Bogdanović, M.D., Dragičević, M.B., Tanić, N.T., Todorović, S.I., Mišić, D., Živković, S.T., Tissier, A., Simonović, A.D., 2013. Reverse transcription of 18S rRNA with Poly (dT) and Other homopolymers. *Plant Mol. Biol. Reports* 31, 55–63.
- Bonaccorso, O., Lee, J.E., Puah, L., Scutt, C.P., Golz, J.F., 2012. Filamentous flower controls lateral organ development by acting as both an activator and a repressor. *BMC Plant Biol.* 12, 176.
- Bondi, M., Lauková, A., de Niederhausern, S., Messi, P., Papadopoulou, C., 2017. Natural preservatives to improve food quality and safety. *Journal of Food Quality*.
- Boros, C.A. and Stermitz, F.R., 1990. Iridoids. An Updated Review. Part I. *Journal of Natural Products*, 53(5), 1055-1147.
- Bošnjak-Neumüller, J., Radaković, M., Djelić, N., Vuković-Gačić, B., Stevanović, Z.D., Kolarević, S., Mišić, D., Stanković, M., Knežević-Vukčević, J., Spremo-Potparević, B., Stanimirović, Z., 2017. *Nepeta rlanjensis* (Lamiaceae), a plant endemic to the Balkans: Phenolic composition, antioxidant activity, and in vitro antigenotoxic effects in triiodothyronine-induced DNA damage in human lymphocytes. *Pak. J. Pharm. Sci.* 30, 625–634.
- Bottini, A.T., Dev, V., Garfagnoli, D.J., Lohani, H., Mathela, C.S., Pant, A.K., 1987. (7R)-Trans, trans-nepetalactone from *Nepeta elliptica*. *Phytochemistry*, 26(4), 1200-1202.
- Bourett, T.M., Howard, R.J., Keefe, D.P.O., Hallahan, D.L., 1994. Gland development on leaf surfaces of *Nepeta racemosa*. *Int. J. Plant Sci.* 155, 623–632.

- Bouvier, F., Suire, C., d'Harlingue, A., Backhaus, R.A., Camara, B., 2000. Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. *The Plant Journal*, 24(2), pp.241-252.
- Božić, D., Papaefthimiou, D., Brückner, K., Vos, R.C.H. de, Tsoleridis, C.A., Katsarou, D., Papanikolaou, A., Pateraki, I., Chatzopoulou, F.M., Dimitriadou, E., Kostas, S., Manzano, D., Scheler, U., Ferrer, A., Tissier, A., Makris, A.M., Kampranis, S.C., Kanellis, A.K., 2015. Towards elucidating carnosic acid biosynthesis in Lamiaceae: Functional characterization of the three first steps of the pathway in *Salvia fruticosa* and *Rosmarinus officinalis*. *PLoS ONE* 10, 1–28. doi:10.1371/journal.pone.0124106
- Božunović, J., Živković, S., Gašić, U., Glamočlija, J., Ćirić, A., Matekalo, D., Šiler, B., Soković, M., Tešić, Ž., Mišić, D., 2018. In vitro and in vivo transformations of *Centaureum erythraea* secoiridoid glucosides alternate their antioxidant and antimicrobial capacity. *Industrial crops and products*, 111, 705-721.
- Bray, E.A., 1993. Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiol.* 103, 1035–1040.
- Bray, E.A., 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in plant science*, 2(2), 48-54.
- Bruni, A., Modenesi, P., 1983. Development, oil storage and dehiscence of peltate trichomes in *Thymus vulgaris* (Lamiaceae). *Nord. J. Bot.* 3, 245–251.
- Brückner, K., Božić, D., Manzano, D., Papaefthimiou, D., Pateraki, I., Scheler, U., Ferrer, A., Vos, R.C.H. De, Kanellis, A.K., Tissier, A., 2014. Characterization of two genes for the biosynthesis of abietane-type diterpenes in rosemary (*Rosmarinus officinalis*) glandular trichomes. *Phytochemistry* 101, 52–64.
- Búfalo, J., Rodrigues, T.M., de Almeida, L.F.R., Tozin, L.R. dos S., Marques, M.O.M., Boaro, C.S.F., 2016. PEG-induced osmotic stress in *Mentha x piperita* L.: Structural features and metabolic responses. *Plant Physiol. Biochem.* 105, 174–184.
- Burda, E., Krauß, M., Fischer, G., Hummel, W., Müller-Uri, F., Kreis, W., Gröger, H., 2009. Recombinant $\Delta^{4,5}$ -Steroid 5β -Reductases as Biocatalysts for the Reduction of Activated C=C-Double Bonds in Monocyclic and Acyclic Molecules. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 351(17), 2787-2790.
- Camp Jr, C.H., Lee, Y.J., Heddleston, J.M., Hartshorn, C.M., Walker, A.R.H., Rich, J.N., Lathia, J.D., Cicerone, M.T., 2014. High-speed coherent Raman fingerprint imaging of biological tissues. *Nat. Photonics* 8, 627–634. doi:10.1038/nphoton.2014.145
- Cantino, P.D., 1992. Evidence for a polyphyletic origin of the Labiatae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 361-379.
- Caser, M., Chitarra, W., D'Angiolillo, F., Perrone, I., Demasi, S., Lovisolo, C., Pistelli, Luisa, Pistelli, Laura, Scariot, V., 2019. Drought stress adaptation modulates plant secondary metabolite production in *Salvia dolomitica* Codd. *Ind. Crops Prod.* 129, 85–96.
- Chalchat, J.C., Gorunovic, M.S., Petrovic, S.D., Maksimovic, Z.A., 2000. Composition of the essential oil of *Nepeta rtanjensis* Diklic et Milojevic, Lamiaceae from Serbia. *Journal of essential oil research*, 12(2), 238-240.
- Chan, K.X., Crisp, P.A., Estavillo, G.M., Pogson, B.J., 2010. Chloroplast-to-nucleus communication: current knowledge, experimental strategies and relationship to drought stress signaling. *Plant signaling & behavior*, 5(12), 1575-1582.

- Chang, T.-H., Hsieh, F.-L., Ko, T.-P., Teng, K.-H., Liang, P.-H., Wang, A.H.-J., 2010. Structure of a Heterotetrameric Geranyl Pyrophosphate Synthase from Mint (*Mentha piperita*) Reveals Intersubunit Regulation. *Plant Cell* 22, 454–467.
- Chang, Y.J., Song, S.H., Park, S.H., Kim, S.U., 2000. Amorpha-4, 11-diene synthase of *Artemisia annua*: cDNA isolation and bacterial expression of a terpene synthase involved in artemisinin biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383(2), 178-184.
- Charles, D.J., Joly, R.J., Simon, J.E., 1990. Effects of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint. *Phytochemistry* 29, 2837–2840.
- Chemler, J.A., Koffas, M.A., 2008. Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Current opinion in biotechnology*, 19(6), 597-605.
- Chen, Y., 2011. Influence of fertilization and drought stress on the growth and production of secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. *J. Med. Plants Res.*, 5, 1749-1755.
- Chezem, W.R., Clay, N.K., 2016. Regulation of plant secondary metabolism and associated specialized cell development by MYBs and bHLHs. *Phytochemistry*, 131, 26-43.
- Chrysargyris, A., Laoutari, S., Litskas, V.D., Stavrinides, M.C., Tzortzakis, N., 2016. Effects of water stress on lavender and sage biomass production, essential oil composition and biocidal properties against *Tetranychus urticae* (Koch). *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 213, 96–103. doi:10.1016/j.scienta.2016.10.024
- Christianson, D.W., 2017. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. *Chemical reviews*, 117(17), 11570-11648.
- Clark, L.J., Hamilton, J.G.C., Chapman, J. V., Rhodes, M.J.C., Hallahan, D.L., 1997. Analysis of monoterpenoids in glandular trichomes of the catmint *Nepeta racemosa*. *Plant J.* 11, 1387–1393.
- Colby, S.M., Alonso, W.R., Katahira, E.J., McGarvey, D.J., Croteau, R., 1993. 4S-limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(31), 23016-23024.
- Colinas, M., Goossens, A., 2018. Combinatorial Transcriptional Control of Plant Specialized Metabolism. *Trends Plant Sci.* 23, 324–336. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.12.006>
- Collu, G., Unver, N., Peltenburg-Looman, A.M.G., Heijden, R. van der, Verpoorte, R., Memmelink, J., 2001. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Fed. European Biochem. Soc.* 508, 215–220.
- Copolovici, L.O., Filella, I., Llusia, J., Niinemets, Ü., Penuelas, J., 2005. The capacity for thermal protection of photosynthetic electron transport varies for different monoterpenes in *Quercus ilex*. *Plant Physiology*, 139(1), 485-496.
- Cotrim, H.C., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., M. Salome S. Pais, 1994. Composition of the Essential Oil from inflorescences of *Nepeta tuberosa* L. ssp. *tuberosa*. *Flavour Fragr. J.* 9, 71–73.
- Coulson, R.N., 1979. Population dynamics of bark beetles. *Annual review of entomology*, 24(1), 417-447.
- Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J., Degenhardt, J., 2010. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant molecular biology*, 73(6), 587-603.

- Crowell, A.L., Williams, D.C., Davis, E.M., Wildung, M.R., Croteau, R., 2002. Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 405(1), 112-121.
- Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Warber, S., Duke, J.A. and Briellmann, H.L., 2016. *Natural products from plants*. CRC press.
- Cui, G., Zhang, Y., Zhang, W., Lang, D., Zhang, X., Li, Z., Zhang, X., 2019. Response of Carbon and Nitrogen Metabolism and Secondary Metabolites to Drought Stress and Salt Stress in Plants. *Journal of Plant Biology*, 62(6), 387-399.
- Cvetković, J., Milutinović, M., Boljević, J., Aničić, N., Nestorović Živković, J., Živković, S. and Mišić, D., 2015. Paraquat-mediated oxidative stress in *Nepeta pannonica* L. *Botanica Serbica*, 39(2).
- D'Auria, J.C., 2006. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current opinion in plant biology*, 9(3), 331-340.
- Daouk, R.K., Dagher, S.M., Sattout, E.J., 1995. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*, 58(10), 1147-1149.
- Davis, E.M., Ringer, K.L., McConkey, M.E., Croteau, R., 2005. Monoterpene metabolism. Cloning, expression, and characterization of menthone reductases from peppermint. *Plant physiology*, 137(3), 873-881.
- Dawson, G.W., Pickett, J.A., Smiley, D.W., 1996. The aphid sex pheromone cyclopentanoids: Synthesis in the elucidation of structure and biosynthetic pathways. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 4(3), pp.351-361.
- De Geyter, N., Gholami, A., Goormachtig, S., Goossens, A., 2012. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci.* 17, 349–359.
- de Kraker, M.E., Stewardson, A.J., Harbarth, S., 2016. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? *PLoS medicine*, 13(11).
- de Ollas, C., Dodd, I.C., 2016. Physiological impacts of ABA–JA interactions under water-limitation. *Plant Mol. Biol.* 91, 641–650. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0503-6>
- De Pooter, H.L., Nicolai, B., De Laet, J., De Buyck, L.F., Schamp, N.M., Goetghebeur, P., 1988. The essential oils of five *Nepeta* Species. A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *Flavour Fragr. J.* 3, 155–159. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730030404>
- de Souza, V.F., Niinemets, Ü., Rasulov, B., Vickers, C.E., Duvoisin Júnior, S., Araújo, W.L., Gonçalves, J.F. de C., 2018. Alternative Carbon Sources for Isoprene Emission. *Trends Plant Sci.* 23, 1081–1101.
- Diklić, N., 1999. *Nepeta rtanjensis* Diklić & Milojević - In: Stevanović V (Ed.), *The red data book of flora of Serbia 1, extinct and critically endangered taxa*, 153-155. GC Etiketa, Beograd.
- Diklić, N. i Milojević, B., 1976. *Nepeta rtanjensis* Diklić et Milojević spec. nov., nova vrsta iz roda *Nepeta* L. *Glas Prir Muz Beogr, Ser B Biol Nauke*.
- Diklić, N., Nikolić, V., 1977. *Nepeta ernesti-mayeri* Diklić & Nikolić sp. nov.—eine neue Art aus der Sektion Pycnonepeta Bentham. *Feddes Repertorium*, 88(7-8), 409-415.
- Dmitrović, S., Dragičević, M., Savić, J., Milutinović, M., Živković, S., Maksimović, V., Matekalo, D., Mišić, D., 2019. Nepetalactone-rich essential oil mitigates phosphinothricin-induced ammonium toxicity in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J. Plant Physiol.* 237, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.04.006>

- Dmitrović, S., Perišić, M., Stojić, A., Živković, S., Boljević, J., Nestorović Živković, J., Aničić, N., Ristić, M., Mišić, D., 2015. Essential oils of two *Nepeta* species inhibit growth and induce oxidative stress in ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) shoots in vitro. *Acta Physiol. Plant.* 37, 1–15.
- Dmitrović, S., Skorić, M., Boljević, J., Aničić, N., Božić, D., Mišić, D., Filipović, V., Opsenica, D., 2016. Elicitation effects of a synthetic 1, 2, 4, 5-tetraoxane and a 2, 5-diphenylthiophene in shoot cultures of two *Nepeta* species. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 81(9), 999-1012.
- Druzinec, D., Salzig, D., Brix, A., Kraume, M., Vilcinskis, A., Kollewe, C. and Czermak, P., 2013. Optimization of insect cell based protein production processes-online monitoring, expression systems, scale up. In: *Yellow Biotechnology II*, Springer, Berlin, Heidelberg. 65-100
- Drusch, S., Ragab, W., 2003. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *Journal of food protection*, 66(8), 1514-1527.
- Duke, M. V, Paul, R.N., Elsohly, H.N., Sturtz, G., Duke, S.O., 2014. Localization of artemisin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. *Int. J. Plant Sci.* 155, 365–372.
- Eisenbraun, E.J., Browne, C.E., Irvin-Willis, R.L., McGurk, D.J., Eliel, E.L., Harris, D.L., 1980. Structure and Stereochemistry 4 α ,7 α ,7 β -Nepetalactone from *Nepeta mussinii* and Its Relationship to the 4 α ,7 α ,7 α - and 4 α ,7 α ,7 β -Nepetalactones from *N. cataria*. *J. Org. Chem.* 45, 3811–3814.
- Eom, S.H., Yang, H.S., Weston, L.A., 2006. An evaluation of the allelopathic potential of selected perennial groundcovers: foliar volatiles of catmint (*Nepeta* \times *faassenii*) inhibit seedling growth. *Journal of chemical ecology*, 32(8), 1835-1848.
- Falara, V., Akhtar, T.A., Nguyen, T.T., Spyropoulou, E.A., Bleeker, P.M., Schauvinhold, I., Matsuba, Y., Bonini, M.E., Schillmiller, A.L., Last, R.L. and Schuurink, R.C., 2011. The tomato terpene synthase gene family. *Plant physiology*, 157(2), 770-789.
- Fellows, R., Russo, C.M., Silva, C.S., Lee, S.G., Jez, J.M., Chisholm, J.D., Zubieta, C. and Nanao, M.H., 2018. A multisubstrate reductase from *Plantago major*: structure-function in the short chain reductase superfamily. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- Fobes, J.F., Mudd, J.B., Marsden, M.P., 1985. Epicuticular lipid accumulation on the leaves of *Lycopersicon pennellii* (Corr.) D'Arcy and *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Physiology*, 77(3), 567-570.
- Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., 2011. Chemical Constituents and Biological Activities of *Nepeta* Species. *Chem. Biodivers.* 8, 1783–1818.
- Galati, E.M., Tzakou, O., Miceli, N., Pizzimenti, F., Rapisarda, A., 2006. Pharmacognostic screening on *Nepeta sibthorpii* Benth. *Recent Progress in Medicinal Plants*, 12, 239-256.
- Gasic, K., Hernandez, A., Korban, S.S., 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol. Biol. Report.* 22.
- Georghiou, K. i Delipetrou, P., 2010. Patterns and traits of the endemic plants of Greece. *Bot. J. Linn. Soc.* 162, 130 – 422.
- Gershenzon, J., Maffei, M., Croteau, R., 1989. Biochemical and Histochemical Localization of Monoterpene Biosynthesis in the Glandular Trichomes of Spearmint (*Mentha spicata*). *Plant Physiol.* 1, 1351–1357.
- Geu-Flores, F., Sherden, N.H., Courdavault, V., Burlat, V., Glenn, W.S., Wu, C., Nims, E., Cui, Y.,

- O'Connor, S.E., 2012. An alternative route to cyclic terpenes by reductive cyclization in iridoid biosynthesis. *Nature* 492, 138–142.
- Ghaninia, M., Larsson, M., Hansson, B.S., Ignell, R., 2008. Natural odor ligands for olfactory receptor neurons of the female mosquito *Aedes aegypti*: use of gas chromatography-linked single sensillum recordings. *Journal of Experimental Biology*, 211(18), 3020-3027.
- Ghirardo, A., Wright, L.P., Bi, Z., Rosenkranz, M., Pulido, P., Rodriguez-Concepcion, M., Niinemets, U., Bruggemann, N., Gershenzon, J., Schnitzler, J.-P., 2014. Metabolic Flux Analysis of Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Poplar Leaves Emitting and Nonemitting Isoprene. *Plant Physiol.* 165, 37–51.
- Gierlinger, N., Schwanninger, M., 2007. The potential of Raman microscopy and Raman imaging in plant research. *Journal of Spectroscopy*, 21(2), 69-89.
- Giraffa, G., Carminati, D., Neviani, E., 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection*, 60(6), 732-738.
- Gkinis, G., Ioannou, E., Quesada, A., Vagias, C., Tzakou, O., Roussis, V., 2008. Parnapimarol and Nepetaparnone from *Nepeta parnassica*. *J. Nat. Prod.* 71, 926–928.
- Gkinis, G., Michaelakis, A., Koliopoulos, G., Ioannou, E., Tzakou, O., Roussis, V., 2014. Evaluation of the repellent effects of *Nepeta parnassica* extract, essential oil, and its major nepetalactone metabolite against mosquitoes. *Parasitology research*, 113(3), 1127-1134.
- Gkinis, G., Tzakou, O., Iliopoulou, D., Roussis, V., 2003. Chemical Composition and Biological Activity of *Nepeta parnassica* Oils and Isolated Nepetalactones. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 58, 681–686.
- Goffreda, J.C., Mutschler, M.A., Ave, D.A., Tingey, W.M., Steffens, J.C., 1989. Aphid deterrence by glucose esters in glandular trichome exudate of the wild tomato, *Lycopersicon pennellii*. *J. Chem. Ecol.* 15, 2135–2147.
- Gong, Z., Yamazaki, M., Sugiyama, M., Tanaka, Y., Saito, K., 1997. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a forma-specific manner in *Perilla frutescens*. *Plant molecular biology*, 35(6), 915-927.
- Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A., Lommel, S.A., 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant–pathogen interactions. *Molecular plant-microbe interactions*, 21(8), 1015-1026.
- Goossens, J., Fernández-Calvo, P., Schweizer, F., Goossens, A., 2016. Jasmonates: signal transduction components and their roles in environmental stress responses. *Plant Mol. Biol.* 91, 673–689.
- Goossens, J., Mertens, J., Goossens, A., 2017. Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling. *J. Exp. Bot.* 68, 1333–1347.
- Griffiths, M.W., Schraft, H., 2017. *Bacillus cereus* food poisoning. In: *Foodborne diseases*. Academic Press. 395-405
- Guérard, N., Maillard, P., Bréchet, C., Lieutier, F., Dreyer, E., 2007. Do trees use reserve or newly assimilated carbon for their defense reactions? A ¹³C labeling approach with young Scots pines inoculated with a bark-beetle-associated fungus (*Ophiostoma brunneo ciliatum*). *Annals of Forest Science*, 64(6), 601-608.
- Guirimand, G., Guihur, A., Phillips, M.A., Oudin, A., Glévarec, G., Melin, C., Papon, N., Clastre, M.,

- St-Pierre, B., Rodríguez-Concepción, M., Burlat, V., 2012. A single gene encodes isopentenyl diphosphate isomerase isoforms targeted to plastids, mitochondria and peroxisomes in *Catharanthus roseus*. *Plant molecular biology*, 79(4-5), 443-459.
- Gupta, A.K., Kaur, N., 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of biosciences*, 30(5), 761-776.
- Hadi, N., Sefidkon, F., Shojaeiyan, A., Šiler, B., Jafari, A.A., Aničić, N., Mišić, D., 2017. Phenolics' composition in four endemic *Nepeta* species from Iran cultivated under experimental field conditions: The possibility of the exploitation of *Nepeta* germplasm. *Ind. Crops Prod.* 95, 475–484.
- Hajiheydari, M.R., Yarmohammadi, M.E., Izadi, P., Jafari, F., Emadi, F., Emaratkar, E., Abtahi, S.H.R., Zargaran, A., Naseri, M., 2017. Effect of *Nepeta bracteata* Benth. on allergic rhinitis symptoms: A randomized double-blind clinical trial. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 22.
- Hall, T., 2013. Biological sequence alignment editor (BioEdit), version 7.2. 5.
- Hallahan, D.L., 2000. Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of Labiate plants. *Advances in Botanical Research* 31, 77-120.
- Hallahan, D.L., West, J.M., Smiley, D.W.M., Pickett, J.A., 1998. Nepetalactol oxidoreductase in trichomes of the catmint *Nepeta racemosa*. *Phytochemistry* 48, 421–427.
- Hallahan, D.L., West, J.M., Wallsgrove, R.M., Smiley, D.W.M., Dawson, G.W., Pickett, J.A., Hamilton, J.G.C., 1995. Purification and characterization of an acyclic monoterpene primary alcohol: NADP+ oxidoreductase from catmint (*Nepeta racemosa*). *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 105–112.
- Handjieva, N. V., Popov, S.S., Evstatieva, L.N., 1996. Constituents of Essential Oils from *Nepeta cataria* L., *N. grandiflora* M.B. and *N. nuda* L. *J. Essent. Oil Res.* 8, 639–643.
- Hänel, H., Raether, W., 1988. A More Sophisticated Method of Determining the Fungicidal Effect of Water-Insoluble Preparations with a Cell Harvester, Using Miconazole as an Example./Eine verbesserte Methode zur Bestimmung der Fungizidie von wasserunlöslichen Präparaten mit Hilfe eines Zellerntegerätes am Beispiel von Miconazol. *Mycoses*, 31(3), 148-154.
- Harb, A., Krishnan, A., Ambavaram, M.M.R., Pereira, A., 2010. Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in Arabidopsis Reveals Early Responses Leading to Acclimation in Plant Growth. *Plant Physiol.* 154, 1254–1271.
- Hardie, J., Peace, L., Pickett, J.A., Smiley, D.W., Storer, J.R., Wadhams, L.J., 1997. Sex pheromone stereochemistry and purity affect field catches of male aphids. *Journal of chemical ecology*, 23(11), 2547-2554.
- Hassan, T., Dar, G.H., Khuroo, A.A., 2011. Taxonomic status of genus *Nepeta* L.(Lamiaceae) in Kashmir Himalaya, India.
- Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R.A., Niknam, V., Razavi, K., Najafi, F., 2014. Effect of penconazole and drought stress on the essential oil composition and gene expression of *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae) at flowering stage. *Acta Physiol. Plant.* 36, 1167–1175. doi:10.1007/s11738-014-1492-1
- Herl, V., Albach, D.C., Müller-Uri, F., Bräuchler, C., Heubl, G., Kreis, W., 2008. Using progesterone 5 β -reductase, a gene encoding a key enzyme in the cardenolide biosynthesis, to infer the phylogeny of the genus *Digitalis*. *Plant systematics and evolution*, 271(1-2), 65-78.
- Herl, V., Fischer, G., Bötsch, R., Müller-Uri, F., Kreis, W., 2006. Molecular cloning and expression of

- progesterone 5 β -reductase (5 β -POR) from *Isoplexis canariensis*. *Planta medica*, 72(12), 1163-1165.
- Herl, V., Fischer, G., Müller-Uri, F., Kreis, W., 2006. Molecular cloning and heterologous expression of progesterone 5 β -reductase from *Digitalis lanata* Ehrh. *Phytochemistry*, 67(3), 225-231.
- Herl, V., Fischer, G., Reva, V.A., Stiebritz, M., Muller, Y.A., Müller-Uri, F., Kreis, W., 2009. The VEP1 gene (At4g24220) encodes a short-chain dehydrogenase/reductase with 3-oxo- $\Delta^{4,5}$ -steroid 5 β -reductase activity in *Arabidopsis thaliana* L. *Biochimie*, 91(4), 517-525.
- Herns, D.A., Mattson, W.J., 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *The quarterly review of biology*, 67(3), 283-335.
- Heywood, V.H., Watson, R.T., 1995. *Global biodiversity assessment* (Vol. 1140). Cambridge: Cambridge university press.
- Higashi, Y., Saito, K., 2013. Network analysis for gene discovery in plant-specialized metabolism. *Plant, cell & environment*, 36(9), 1597-1606.
- Hohl, M., Schopfer, P., 1991. Water relations of growing maize coleoptiles: comparison between mannitol and polyethylene glycol 6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. *Plant Physiology*, 95(3), 716-722.
- Hu, Y., Liu, W., Malwal, S.R., Zheng, Y., Feng, X., Ko, T.P., Chen, C.C., Xu, Z., Liu, M., Han, X., Gao, J., 2015. Structures of iridoid synthase from *Cantharanthus roseus* with bound NAD⁺, NADPH, or NAD⁺/10-Oxogeraniol: reaction mechanisms. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(51), 15478-15482.
- Huang, S.-S., Kirchoff, B.K., Liao, J.-P., 2008. The capitate and peltate glandular trichomes of *Lavandula pinnata* L. (Lamiaceae): Histochemistry, ultrastructure, and secretion. *J. Torrey Bot. Soc.* 135, 155–167.
- Hult, K. and Berglund, P., 2007. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends in biotechnology*, 25(5), 231-238.
- Hussain, J., Jamila, N., Gilani, S.A., Abbas, G., Ahmed, S., 2009. Platelet aggregation, antiglycation, cytotoxic, phytotoxic and antimicrobial activities of extracts of *Nepeta juncea*. *African Journal of Biotechnology*, 8(6).
- Husain, S.Z., Marin, P.D., Diklić, N., Patcović, B., 1989. Micromorphological and phytochemical studies in two new endemic *Nepeta* (Lamiaceae) species in Yugoslavia. *Pakistan J. Bot.* 21, 210–217.
- Iijima, Y., Gang, D.R., Fridman, E., Lewinsohn, E., Pichersky, E., 2004. Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant physiology*, 134(1), 370-379.
- Ikedo, H., Esaki, N., Nakai, S., Hashimoto, K., Uesato, S., Soda, K., Fujita, T., 1991. Acyclic monoterpene primary alcohol: NADP⁺ oxidoreductase cells: The key enzyme in biosynthesis of monoterpene alcohols. *J. Biochem.* 109, 341–347.
- Ito, M., Honda, G., 2007. Geraniol synthases from perilla and their taxonomical significance. *Phytochemistry*, 68(4), 446-453.
- Jamzad, Z., Chase, M.W., Ingrouille, M., Simmonds, M.S.J., Jalili, A., 2003. Phylogenetic relationships in *Nepeta* L. (Lamiaceae) and related genera based on ITS sequence data. *Taxon* 52, 21–32.
- Kakuta, H., Seki, T., Hashidoko, Y., Mizutani, J., Kakuta, H., Seki, T., Hashidoko, Y., Mizutani, J., 1992. Ent-kaurenic acid and its related compounds from glandular trichome exudate and leaf extracts of *Polymnia sonchifolia*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1562–1564. doi:10.1271/bbb.56.1562

- Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mentis, A., Mitaku, S., Charvala, C., 2001. Composition of the essential oil of two *Nepeta* species and in vitro evaluation of their activity against *Helicobacter pylori*. *Planta medica*, 67(09), 880-883.
- Kazan, K., Manners, J.M., 2013. MYC2: the master in action. *Molecular plant*, 6(3), 686-703.
- Keene, C.K., Wagner, G.J., 1985. Direct demonstration of divatrienediol biosynthesis in glandular heads of tobacco trichomes. *Plant Physiol.* 79, 1026–1032.
- Kidd, T., Easson, M.L., Qu, Y., De Luca, V., 2019. Inter-organ transport of secologanin allows assembly of monoterpene indole alkaloids in a *Catharanthus roseus* mutant. *Phytochemistry* 159, 119–126.
- Kobaisy, M., Tellez, M.R., Schrader, K.K., Wedge, D.E., Sitpaeva, G.T., Gemejjeva, N.G., Mukanova, G.S., Mamonov, L.K., 2006. Phytotoxic, antialgal, and antifungal activity of constituents from selected plants of Kazakhstan.
- Kordali, S., Usanmaz, A., Cakir, A., Cavusoğlu, A., Ercisli, S., 2013. In Vitro Antifungal Effect of Essential Oils from *Nepeta meyeri* Benth. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 23(2).
- Kökdil, G., Kurucu, S., Yıldız, A., 1998. Essential oil composition of *Nepeta nuda* L. ssp. *nuda*. *Flavour Fragr. J.* 13, 233–234.
- Krainer, F.W., Pletzenauer, R., Rossetti, L., Herwig, C., Glieder, A., Spadiut, O., 2014. Purification and basic biochemical characterization of 19 recombinant plant peroxidase isoenzymes produced in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 95, 104-112.
- Krasensky, J., Jonak, C., 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, 63(4), 1593-1608.
- Kreis, W., Munkert, J., 2019. Exploiting enzyme promiscuity to shape plant specialized metabolism. *Journal of experimental botany*, 70(5), 1435-1445.
- Kries, H., Caputi, L., Stevenson, C.E.M., Kamileen, M.O., Sherden, N.H., Geu-Flores, F., Lawson, D.M., O'Connor, S.E., 2016. Structural determinants of reductive terpene cyclization in iridoid biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* 12, 6–8.
- Kries, H., Kellner, F., Kamileen, M.O., O'Connor, S.E., 2017. Inverted stereocontrol of iridoid synthase in snapdragon. *J. Biol. Chem.* 292, 14659–14667.
- Krithika, R., Srivastava, P.L., Rani, B., Kolet, S.P., Chopade, M., Soniya, M., Thulasiram, H. V., 2015. Characterization of 10-hydroxygeraniol dehydrogenase from *Catharanthus roseus* reveals cascaded enzymatic activity in iridoid biosynthesis. *Sci. Rep.* 1–6.
- Kumar, V., Mathela, C.S., Tewari, G., Singh, D., 2014. Antifungal activity of *Nepeta elliptica* Royle ex Benth. oil and its major constituent (7R)-trans,trans-nepetalactone: A comparative study. *Industrial Crops and Products*, 55, 70-74.
- Landmann, C., Fink, B., Festner, M., Dregus, M., Engel, K.H. and Schwab, W., 2007. Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 465(2), 417-429.
- Laue, G., Preston, C.A., Baldwin, I.T., 2000. Fast track to the trichome: induction of N-acyl nornicotines precedes nicotine induction in *Nicotiana repanda*. *Planta*, 210(3), 510-514.
- Laule, O., Fürholz, A., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P.B., Grisse, W., Lange, M., 2003. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6866-6871.

- Layeghhaghighi, M., Abbaszadeh, B., Tabaei Aghdaei, S.R.T., Samadiyan Sarbangholi, V., 2014. Morphophysiological response of *Nepeta racemosa* Lam. to drought stress. *Iran. J. Med. Aromat. Plants* 31, 587–597.
- Layeghhaghighi, M., Asil, M.H., Abbaszadeh, B., Sefidkon, F., Matinizadeh, M., 2017. Investigation of Altitude on Morphological Traits and Essential Oil Composition of *Nepeta pogonosperma* Jamzad and Assadi from Alamut Region. *J. Med. Plants By-products* 1, 35–40.
- Lee, S.C., Luan, S., 2012. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, cell & environment*, 35(1), 53-60.
- Markus Lange, B., Turner, G.W., 2013. Terpenoid biosynthesis in trichomes—current status and future opportunities. *Plant biotechnology journal*, 11(1), 2-22.
- Langenheim, J.H., 2003. *Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany* (No. 620.1924 L275p). Oregon, US: Timber Press.
- Letchamo, W., Korolyuk, E.A., Tkachev, A.V., 2005. Chemical screening of essential oil bearing flora of Siberia IV. Composition of the essential oil of *Nepeta sibirica* L. tops from Altai region. *Journal of Essential Oil Research*, 17(5), 487-489.
- Lewinsohn, E., Gijzen, M., Croteau, R., 1991. Defense mechanisms of conifers: differences in constitutive and wound-induced monoterpene biosynthesis among species. *Plant physiology*, 96(1), 44-49.
- Liblikas, I., Santangelo, E.M., Sandell, J., Baeckström, P., Svensson, M., Jacobsson, U., Unelius, C.R., 2005. Simplified isolation procedure and interconversion of the diastereomers of nepetalactone and nepetalactol. *Journal of natural products*, 68(6), 886-890.
- Lichman, B.R., Kamileen, M.O., Titchiner, G.R., Saalbach, G., Stevenson, C.E.M., Lawson, D.M., O'Connor, S.E., 2019a. Uncoupled activation and cyclization in catmint reductive terpenoid biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* 15, 71–79.
- Lichman, B.R., O'Connor, S.E., Kries, H., 2019b. Biocatalytic Strategies towards [4+2] Cycloadditions. *Chem. - A Eur. J.* 25, 6864–6877.
- Lichman, B.R., Godden, G.T., Hamilton, J.P., Palmer, L., Kamileen, M.O., Zhao, D., Vaillancourt, B., Wood, J.C., Sun, M., Kinser, T.J., Henry, L.K., 2020. The evolutionary origins of the cat attractant nepetalactone in catnip. *Science Advances*, 6(20), p.eaba0721.
- Lichtenthaler, H.K., 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, 50(1), 47-65.
- Lin-Vien, D., Colthup, N.B., Fateley, W.G., Grasselli, J.G., 1991. *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*. Elsevier.
- Liu, J., Liu, Y., Wang, Y., Zhang, Z.H., Zu, Y.G., Efferth, T., Tang, Z.H., 2016. The combined effects of ethylene and MeJA on metabolic profiling of phenolic compounds in *Catharanthus roseus* revealed by metabolomics analysis. *Frontiers in physiology*, 7, 217.
- Liu, R., Li, X., Lam, K.S., 2017. Combinatorial chemistry in drug discovery. *Current opinion in chemical biology*, 38, 117-126.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 Method. *Methods* 408, 402–408.
- Ljaljević-Grbić, M., 2006. Ispitivanje interakcije rtanjske metvice (*Nepeta rtanjensis* Diklić et Milojević)

i odabranih mikromiceta. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.

- Llusià, J., Peñuelas, J., Alessio, G.A., Estiarte, M., 2006. Seasonal contrasting changes of foliar concentrations of terpenes and other volatile organic compound in four dominant species of a Mediterranean shrubland submitted to a field experimental drought and warming. *Physiologia Plantarum*, 127(4), 632-649.
- Lorenz, M., Boland, W., Dettner, K., 1993. Biosynthesis of iridodials in the defense glands of beetle larvae (Chrysomelinae). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32(6), 912-914.
- Loreto, F., Dicke, M., Schnitzler, J.P., Turlings, T.C., 2014. Plant volatiles and the environment. *Plant, cell & environment*, 37(8), 1905-1908.
- Lupien, S., Karp, F., Wildung, M., Croteau, R., 1999. Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha*) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression of (-)-4S-limonene-3-hydroxylase and (-)-4S-limonene-6-hydroxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 368(1), 181-192.
- Lynen, F., 1967. Biosynthetic pathways from acetate to natural products. *Pure and Applied Chemistry*, 14(1), 137-168.
- Ma, Y., Dai, X., Xu, Y., Luo, W., Zheng, X., Zeng, D., Pan, Y., Lin, X., Liu, H., Zhang, D., Xiao, J., 2015. COLD1 confers chilling tolerance in rice. *Cell*, 160(6), 1209-1221.
- Maffei, M.E., 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*, 76(4), 612-631.
- Majdi, M., Liu, Q., Karimzadeh, G., Ali, M., Beekwilder, J., Simonović, A., Cankar, K., Vos, R. De, Todorović, S., 2011. Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Phytochemistry* 72, 1739–1750. doi:10.1016/j.phytochem.2011.04.021
- Majdi, M., Mashhady, A.M., Maroufi, A., Crocoll, C., 2017. Tissue-specific gene-expression patterns of genes associated with thymol/carvacrol biosynthesis in thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their differential changes upon treatment with abiotic elicitors. *Plant Physiol. Biochem.* doi:10.1016/j.plaphy.2017.03.016
- Malik, S., Cusidó, R.M., Mirjalili, M.H., Moyano, E., Palazón, J., Bonfill, M., 2011. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. *Process Biochemistry*, 46(1), 23-34.
- Mancini, E., Apostolides Arnold, N., De Feo, V., Formisano, C., Rigano, D., Piozzi, F., Senatore, F., 2009. Phytotoxic effects of essential oils of *Nepeta curviflora* Boiss. and *Nepeta nuda* L. subsp. *albiflora* growing wild in Lebanon. *Journal of Plant Interactions*, 4(4), 253-259.
- Manukyan, A., 2011. Effect of Growing Factors on Productivity and Quality of Lemon Catmint, Lemon Balm and Sage under Soilless Greenhouse Production : I. Drought Stress. *Med. Arom. Plant Sci. Biotech.* 5, 119–125.
- Marin P., Tatić B., 2004. Etimološki rečnik naziva rodova i vrsta vaskularne flore Evrope., NNK-International, Beograd.
- McCaskill, D., Gershenzon, J., Croteau, R., 1992. Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Planta* 187, 445–454.

- McDowell, N.G., 2011. Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant physiology*, 155(3), 1051-1059.
- McElvain, S.M., Bright, R.D., Johnson, P.R., 1941. The constituents of the volatile oil of catnip. I. Nepetalic acid, nepetalactone and related compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 63(6), 1558-1563.
- Mercke, P., Bengtsson, M., Bouwmeester, H.J., Posthumus, M.A., Brodelius, P.E., 2000. Molecular cloning, expression, and characterization of amorpho-4, 11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 381(2), 173-180.
- Miceli, N., Taviano, M.F., Giuffrida, D., Trovato, A., Tzakou, O., Galati, E.M., 2005. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Benth. *J. Ethnopharmacol.* 97, 261–266.
- Michel, B.E., 1983. Evaluation of the Water Potentials of Solutions of Polyethylene Glycol 8000 Both in the Absence and Presence of Other Solutes. *Plant Physiol.* 72, 66–70. <https://doi.org/10.1104/pp.72.1.66>
- Miettinen, K., Dong, L., Navrot, N., Schneider, T., Burlat, V., Ilc, T., Verpoorte, R., Pollier, J., Woittiez, L., Krol, S. Van Der, Martinoia, E., Bouwmeester, H., Goossens, A., Memelink, J., Werck-Reichhart, D., 2014. The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus*. *Nat. Commun.* 5.
- Mišić, D., Šiler, B., Gašić, U., Avramov, S., Živković, S., Nestorović Živković, J., Milutinović, M., Tešić, Ž., 2015. Simultaneous UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS analysis of phenolic acids and nepetalactones in methanol extracts of *Nepeta* species: A possible application in chemotaxonomic studies. *Phytochem. Anal.* 26, 72–85.
- Mišić, D.M., Ghalawenji, N.A., Grubišić, D. V., Konjević, R.M., 2005. Micropropagation and reintroduction of *Nepeta rtanjensis*, an endemic and critically endangered perennial of Serbia. *Phyt. - Ann. Rei Bot.* 45, 9–20.
- Mizutani, M., Ohta, D., 2010. Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annual review of plant biology*, 61, 291-315.
- Moghe, G.D., Shiu, S.H., 2014. The causes and molecular consequences of polyploidy in flowering plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1320(1), 16-34.
- Mohamed, H.F.Y., Mahmoud, A.A., Alatawi, A., Hegazy, M.H., Astatkie, T., Said-Al Ahl, H.A.H., 2018. Growth and essential oil responses of *Nepeta* species to potassium humate and harvest time. *Acta Physiol. Plant.* 40, 1–8.
- Morshedloo, M.R., Craker, L.E., Salami, A., Nazeri, V., Sang, H., Maggi, F., 2017. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono- and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant physiology and biochemistry*, 111, 119-128.
- Moummou, H., Kallberg, Y., Tonfack, L.B., Persson, B., Van Der Rest, B., 2012. The plant short-chain dehydrogenase (SDR) superfamily: genome-wide inventory and diversification patterns. *BMC plant biology*, 12(1), 219.
- Munemasa, S., Hauser, F., Park, J., Waadt, R., Brandt, B., Schroeder, J.I., 2015. Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Current opinion in plant biology*, 28, 154-162.
- Munkert, J., Pollier, J., Miettinen, K., Van Moerkercke, A., Payne, R., Müller-Uri, F., Burlat, V., O'Connor, S.E., Memelink, J., Kreis, W., Goossens, A., 2015. Iridoid synthase activity is common

- among the plant progesterone 5 β -reductase family. *Molecular plant*, 8(1), 136-152.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, 25(2), 239-250.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- Nadjafi, F., Koochbeki, A., Rezvani Moghadam, P., Honermeier, B., 2012. First experiments on cultivation of *Nepeta binaludensis* Jamzad - An example of domestication of a highly endangered medicinal plant of Iran. *Zeitschrift fur Arznei- und Gewurzpflanzen* 17, 64–71.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P., Jones, J.D., 2008. DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology*, 18(9), 650-655.
- Neill, S., 2007. Interactions between abscisic acid, hydrogen peroxide and nitric oxide mediate survival responses during water stress. *The New phytologist*, 175(1), 4-6.
- Németh-Zámbori, É., Szabó, K., Pluhár, Z., Radácsi, P., Inotai, K., 2016. Changes in biomass and essential oil profile of four Lamiaceae species due to different soil water levels. *J. Essent. Oil Res.* 28, 391–399. doi:10.1080/10412905.2016.1176606
- Nestorović, J., Mišić, D., Šiler, B., Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Maksimović, V., Grubišić, D., 2010. Nepetalactone content in shoot cultures of three endemic *Nepeta* species and the evaluation of their antimicrobial activity. *Fitoterapia* 81, 621–626. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.03.007>
- Nestorović Živković, J.M., 2013. Antioksidativno, antimikrobno i alelopatsko dejstvo tri endemične vrste roda *Nepeta* (Lamiaceae). Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.
- Nestorović Živković, J., Dmitrović, S., Jovanović, V., Živković, S., Božić, D., Aničić, N., Mišić, D., 2016. Allelopathic potential of essential oil of *Nepeta rtanjansis*. *Allelopath. J.* 36, 207–219.
- Nestorović Živković, J., Živković, S., Šiler, B., Aničić, N., Dmitrović, S., Divac-Rankov, A., Giba, Z., Mišić, D., 2018. Differences in bioactivity of three endemic *Nepeta* species arising from main terpenoid and phenolic constituents. *Archives of Biological Sciences*, 70(1), 63-76.
- Nešković, M., Konjević, R. Ćulafić Lj., 2003: Fiziologija biljaka. NNK-International, Beograd.
- Nia, A.M., Kalantaripour, T.P., Basiri, M., Vafae, F., Asadi-Shekaari, M., Eslami, A. and Zadeh, F.D., 2017. *Nepeta dschuparensis* Bornm extract moderates COX-2 and IL-1 β proteins in a rat model of cerebral ischemia. *Iranian journal of medical sciences*, 42(2), 179.
- Novy, R., 2001. Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Innovations*, 12, 1-3.
- Nowak, M., Kleinwaechter, M., Manderscheid, R., Weigel, H.J., Selmar, D., 2010. Drought stress increases the accumulation of monoterpenes in sage (*Salvia officinalis*), an effect that is compensated by elevated carbon dioxide concentration. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83(2), 133-136.
- Nómeth-Zámbori, É., Pluhár, Z., Szabó, K., Malekzadeh, M., Radácsi, P., Inotai, K., Komáromi, B., Seidler-Lozykowska, K., 2016. Effect of water supply on growth and polyphenols of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Acta Biologica Hungarica*, 67(1), 64-74.
- O'Neill J, Chair., 2016. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. London, UK: Review on Antimicrobial Resistance; 1-84
- Oka, Y., Ben-Daniel, B.-H., Cohen, Y., 2001. Nematicidal activity of powder and extracts of *Inula*

viscosa. *Nematology* 3, 735–742.

- Oliver, S.P., Jayarao, B.M., Almeida, R.A., 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2(2), 115-129.
- Olsson, M.E., Olofsson, L.M., Lindahl, A.L., Lundgren, A., Brodelius, M., Brodelius, P.E., 2009. Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L. *Phytochemistry*, 70(9), 1123-1128.
- Osmolovskaya, N., Shumilina, J., Kim, A., Didio, A., Grishina, T., Bilova, T., Keltsieva, O.A., Zhukov, V., Tikhonovich, I., Tarakhovskaya, E., Frolov, A., 2018. Methodology of drought stress research: Experimental setup and physiological characterization. *International journal of molecular sciences*, 19(12), p.4089.
- Pan, Q., Mustafa, N.R., Tang, K., Choi, Y.H., Verpoorte, R., 2016. Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: a literature review from genes to metabolites. *Phytochem. Rev.* 15, 221–250.
- Paul, P., Singh, S.K., Patra, B., Sui, X., Pattanaik, S., Yuan, L., 2017. A differentially regulated AP 2/ERF transcription factor gene cluster acts downstream of a MAP kinase cascade to modulate terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *New Phytologist*, 213(3), 1107-1123.
- Payne, W.W., 1978. A glossary of plant hair terminology. *Brittonia*, 30(2), 239-255.
- Pickett, J.A., Allemann, R.K., Birkett, M.A., 2013. The semiochemistry of aphids. *Natural product reports*, 30(10), 1277-1283.
- Patience, G.S., Karirekinyana, G., Galli, F., Patience, N.A., Kubwabo, C., Collin, G., Bizimana, J.C., Boffito, D.C., 2018. Sustainable manufacture of insect repellents derived from *Nepeta cataria*. *Sci. Rep.* 8, 2235.
- Peñuelas, J., Llusià, J., 2003. BVOCs: plant defense against climate warming? *Trends in plant science*, 8(3), 105-109.
- Peplow, M., 2016. Synthetic biology's first malaria drug meets market resistance. *Nature News*, 530(7591), 389.
- Pérez, A.C., Goossens, A., 2013. Jasmonate signalling: a copycat of auxin signalling? *Plant. Cell Environ.* 36, 2071–2084.
- Pérez-Bermúdez, P., Moya García, A.A., Tuñón, I., Gavidia, I., 2010. *Digitalis purpurea* P5 β R2, encoding steroid 5 β -reductase, is a novel defense-related gene involved in cardenolide biosynthesis. *New Phytologist*, 185(3), 687-700.
- Petersen, J., Lanig, H., Munkert, J., Bauer, P., Müller-Uri, F., Kreis, W., 2016. Progesterone 5 β -reductases/iridoid synthases (PRISE): gatekeeper role of highly conserved phenylalanines in substrate preference and trapping is supported by molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 34(8), 1667-1680.
- Peterson, C., Coats, J., 2001. Insect repellents-past, present and future. *Pesticide Outlook*, 12(4), 154-158.
- Peterson, C.J., Nemetz, L.T., Jones, L.M., Coats, J.R., 2002. Behavioral activity of catnip (Lamiaceae) essential oil components to the german cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Entomol. Soc. Am.* 95,

377–380.

- Petković, B., Merkulov, Lj., Duletić-Laušević, S., 2005. Anatomija biljaka sa praktikumom
- Petry, R., Schmitt, M., Popp, J., 2003. Raman spectroscopy--a prospective tool in the life sciences. *Chemphyschem* 4, 14–30. doi:10.1002/cphc.200390004
- Poorter, H., Villar, R., 1997. Chemical composition of plants: causes and consequences of variation in allocation of C to different plant constituents. *Plant Resource Allocation*. Academic Press, New York, 39-72.
- Priyanka, B., Patil, R.K., Dwarakanath, S., 2016. A review on detection methods used for foodborne pathogens. *The Indian journal of medical research*, 144(3), 327.
- Proestos, C., Boziaris, I.S., Nychas, G.-J.E., Komaitis, M., 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem.* 95, 664–671.
- Prince, V.E., Pickett, F.B., 2002. Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nature Reviews Genetics*, 3(11), 827-837.
- Puértolas, J., Alcobendas, R., Alarcón, J.J., Dodd, I.C., 2013. Long-distance abscisic acid signalling under different vertical soil moisture gradients depends on bulk root water potential and average soil water content in the root zone. *Plant, Cell Environ.* 36, 1465–1475.
- R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Radwan, A., Kleinwächter, M., Selmar, D., 2017. Impact of drought stress on specialised metabolism: biosynthesis and the expression of monoterpene synthases in sage (*Salvia officinalis*). *Phytochemistry*, 141, 20-26.
- Rai, A., Smita, S.S., Singh, A.K., Shanker, K., Nagegowda, D.A., 2013. Heteromeric and homomeric geranyl diphosphate synthases from *Catharanthus roseus* and their role in monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Mol. Plant* 6, 1531–1549. doi.org/10.1093/mp/sst058
- Ramezan, G., Abbaszadeh, B., 2016. The effect of drought stress on yield, content and percentage of essential oil of *Nepeta pogonosperma* Jamzad et Assadi under different plant density. *Iran. J. Med. Aromat. Plants* 31, 1071–1085.
- Ramirez, A.M., Stoop, G., Menzel, T.R., Gols, R., Bouwmeester, H.J., Dicke, M., Jongsma, M.A., 2012. Bidirectional secretions from glandular trichomes of pyrethrum enable immunization of seedlings. *The Plant Cell*, 24(10), 4252-4265.
- Rao, S., Jabeen, F.T.Z., 2013. In vitro selection and characterization of polyethylene glycol (PEG) tolerant callus lines and regeneration of plantlets from the selected callus lines in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(2), 261-268.
- Rapisarda, A., Galati, E.M., Tzakou, O., Flores, M., Miceli, N., 2001. *Nepeta sibthorpii* Benth (Lamiaceae): micromorphological analysis of leaves and flowers. *Farm.* 56, 413–415. doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01050-3
- Razavizadeh, R., Farahzadianpoor, F., Adabavazeh, F., Komatsu, S., 2019. Physiological and morphological analyses of *Thymus vulgaris* L. in vitro cultures under polyethylene glycol (PEG)-induced osmotic stress. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(3), 342-357.
- Reddy, V.A., Wang, Q., Dhar, N., Kumar, N., Venkatesh, P.N., Rajan, C., Panicker, D., Sridhar, V., Mao,

- H.Z., Sarojam, R., 2017. Spearmint R2R3-MYB transcription factor MsMYB negatively regulates monoterpene production and suppresses the expression of geranyl diphosphate synthase large subunit (MsGPPS.LSU). *Plant Biotechnol. J.* 15, 1105–1119. doi.org/10.1111/pbi.12701
- Regnier, F.E., Waller, G.R., Eisenbraun, E.J., 1967. Studies on the composition of the essential oils of three *Nepeta* species. *Phytochemistry* 6, 1281–1289. doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86090-2
- Reichert, W., Ejercito, J., Guda, T., Dong, X., Wu, Q., Ray, A., Simon, J.E., 2019. Repellency assessment of *Nepeta cataria* essential oils and isolated nepetalactones on *Aedes aegypti*. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.
- Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B., Palnikar, P., 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(9), 3471-3475.
- Reverchon, E., Rubilli, V., 1997. Tuberose Concrete Fractionation by Supercritical Carbon Dioxide. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1356–1360.
- Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A., 2001. Stress factors, their influence on plant metabolism, and tolerance or resistance to stress. *Plant Stress Physiology*, 23, 1-7.
- Rigano, D., Arnold, N.A., Conforti, F., Menichini, F., Formisano, C., Piozzi, F., Senatore, F., 2011. Characterisation of the essential oil of *Nepeta glomerata* Montbret et Aucher ex Benthams from Lebanon and its biological activities. *Natural product research*, 25(6), 614-626.
- Rivasseau, C., Seemann, M., Boisson, A.M., Streb, P., Gout, E., Douce, R., Rohmer, M., Bligny, R., 2009. Accumulation of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in illuminated plant leaves at supraoptimal temperatures reveals a bottleneck of the prokaryotic methylerythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant, Cell Environ.* 32, 82–92. doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01903.x
- Rodríguez-Concepción, M., Boronat, A., 2015. Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 25, 17-22.
- Rohani, E.R., Chiba, M., Kawaharada, M., Asano, T., Oshima, Y., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Fukushima, A., Rai, A., Saito, K., Yamazaki, M., 2016. An MYB transcription factor regulating specialized metabolisms in *Ophiorrhiza pumila*. *Plant Biotechnol.* 33, 1–9. doi.org/10.5511/plantbiotechnology.15.1117a
- Rudolph, K., Wiegert, T., Schubert, R., Müller-Uri, F., 2016. The occurrence of progesterone 5 β -reductase is not limited to the angiosperms: a functional gene was identified in *Picea sitchensis* and expressed in *Escherichia coli*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 46(1), p.7.
- Said-Al Ahl, H.A.H., Sabra, A.S., Hegazy, M.H., 2016. Salicylic acid improves growth and essential oil accumulation in two *Nepeta cataria* chemotypes under water stress conditions. *Ital. J. Agrometeorol.* 21, 25–36. doi.org/10.19199/2016.1.2038-5625.025
- Sakurai, K., Ikeda, K., Mori, K., 1988. Both (4aS, 7S, 7aR)-(+)-nepetalactone and its antipode are powerful attractants for cats. *Agric. Biol. Chem.* 52, 2369–2371. doi.org/10.1271/bbb1961.52.2369
- Sangwan, V., Örvär, B.L., Beyerly, J., Hirt, H., Dhindsa, R.S., 2002. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *The Plant Journal*, 31(5), 629-638.
- Saraç, N., Uğur, A., 2009. The in vitro antimicrobial activities of the essential oils of some Lamiaceae species from Turkey. *Journal of medicinal food*, 12(4), 902-907.
- Sastry, S.D., Springstube, W.R., Waller, G.R., 1972. Identification of 5,9-dehydronepetalactone, a new

monoterpene from *Nepeta cataria*. *Phytochemistry* 11, 453–455. doi.org/10.1016/s0031-9422(00)90053-0

- Savchenko, T., Kolla, V.A., Wang, C.-Q., Nasafi, Z., Hicks, D.R., Phadungchob, B., Chehab, W.E., Brandizzi, F., Froehlich, J., Dehesh, K., 2014. Functional Convergence of Oxylipin and Abscisic Acid Pathways Controls Stomatal Closure in Response to Drought. *Plant Physiol.* 164, 1151–1160. doi.org/10.1104/pp.113.234310
- Savić-Pavićević, D., Matic, G., 2011. *Molekularna biologija 1*, NNK International, Beograd, ISBN: 978-86-6157-001-8
- Scharf, K.D., Berberich, T., Ebersberger, I., Nover, L., 2012. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 104-119.
- Scheler, U., Brandt, W., Porzel, A., Rothe, K., Manzano, D., Božić, D., Papaefthimiou, D., Balcke, G.U., Henning, A., Lohse, S., Marillonnet, S., Kanellis, A.K., Ferrer, A., Tissier, A., 2016. Elucidation of the biosynthesis of carnosic acid and its reconstitution in yeast. *Nat. Commun.* 7. doi:10.1038/ncomms12942
- Schillmiller, A.L., Schauvinhold, I., Larson, M., Xu, R., Charbonneau, A.L., Schmidt, A., Wilkerson, C., Last, R.L., Pichersky, E., 2009. Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *PNAS* 106, 10865–10870.
- Schmidt, K., Petersen, J., Munkert, J., Egerer-Sieber, C., Hornig, M., Muller, Y.A., Kreis, W., 2018. PRISEs (progesterone 5 β -reductase and/or iridoid synthase-like 1, 4-enone reductases): Catalytic and substrate promiscuity allows for realization of multiple pathways in plant metabolism. *Phytochemistry*, 156, 9-19.
- Schmidt, A., Wächtler, B., Temp, U., Krekling, T., Séguin, A., Gershenzon, J., 2010. A Bifunctional Geranyl and Geranylgeranyl Diphosphate Synthase Is Involved in Terpene Oleoresin Formation in *Picea abies*. *Plant Physiol.* 152, 639–655.
- Schorr, K., Costa, F.B. Da, 2005. Quantitative determination of enhydrin in leaf rinse extracts and in glandular trichomes of *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* 165, 161–165.
- Schultz, G., Simbro, E., Belden, J., Zhu, J., Coats, J., 2004. Catnip, *Nepeta cataria* (Lamiales: Lamiaceae)—A closer look: Seasonal occurrence of nepetalactone isomers and comparative repellency of three terpenoids to insects. *Environmental entomology*, 33(6), 1562-1569.
- Schulz, H., Baranska, M., 2007. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 43, 13–25. doi:10.1016/j.vibspec.2006.06.001
- Schulz, H., Schrader, B., Quilitzsch, R., Pfeffer, S., Krüger, H., 2003. Rapid classification of basil chemotypes by various vibrational spectroscopy methods. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2475–2481. doi:10.1021/jf021139r
- Schuurink, R., Tissier, A., 2020. Glandular trichomes: micro-organs with model status? *New Phytologist*, 225(6), 2251-2266.
- Selmar, D., Kleinwächter, M., 2013. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. *Plant and Cell Physiology*, 54(6), 817-826.

- Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, T., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., 2002. Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional & integrative genomics*, 2(6), 282-291.
- Seo, K.S., Bohach, G.A., 2007. Foodborne pathogenic bacteria. *Staphylococcus aureus*. *Food microbiology, fundamentals and frontiers*, ASM Press, WA, 493-518.
- Severson, R.F., Arrendale, R.F., Chortyk, O.T., Johnson, A.W., Jackson, D.M., Gwynn, G.R., Chaplin, J.F., Stephenson, M.G., 1984. Quantitation of the major cuticular components from green leaf of different tobacco types. *J. Agric. Food Chem.* 32, 566–570. doi:10.1021/jf00123a037
- Shafaghat, A., Oji, K., 2010. Nepetalactone content and antibacterial activity of the essential oils from different parts of *Nepeta persica*. *Natural product communications*, 5(4), p.1934578X1000500427.
- Sherden, N.H., Lichman, B.R., Caputi, L., Zhao, D., Kamileen, M.O., Buell, C.R., O'Connor, S.E., 2017. Identification of iridoid synthases from *Nepeta* species: Iridoid cyclization does not determine nepetalactone stereochemistry. *Manuscr. Submitt.* 1–34.
- Shi, P., Fu, X., Liu, M., Shen, Q., Jiang, W., Li, L., Sun, X., Tang, K., 2017. Promotion of artemisinin content in *Artemisia annua* by overexpression of multiple artemisinin biosynthetic pathway genes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 129(2), 251-259.
- Shibuya, T., Itagaki, K., Ueyama, S., Hirai, N., Endo, R., 2016. Atmospheric humidity influences oviposition rate of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) through morphological responses of host *Cucumis sativus* leaves. *Journal of economic entomology*, 109(1), 255-258.
- Shu, J.J. (1994). *Nepeta* Linnaeus. *Flora of China* 17: 107-118.
- Siebert, D.J., 2004. Localization of salvinorin A and related compounds in glandular trichomes of the psychoactive sage, *Salvia divinorum*. *Ann. Bot.* 93, 763–771. doi:10.1093/aob/mch089
- Smith, K.J., Neafie, R., Yeager, J., Skelton, H.G., 1999. *Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease. *The British journal of dermatology*, 141(3), 558-561.
- Simkin, A.J., Guirimand, G., Papon, N., Courdavault, V., Thabet, I., Ginis, O., Bouzid, S., Giglioli-Guivarc'h, N., Clastre, M., 2011. Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. *Planta*, 234(5), 903
- Simkin, A.J., Miettinen, K., Claudel, P., Burlat, V., Guirimand, G., Courdavault, V., Papon, N., Meyer, S., Godet, S., St-Pierre, B., Giglioli-Guivarch, N., 2013. Characterization of the plastidial geraniol synthase from Madagascar periwinkle which initiates the monoterpene branch of the alkaloid pathway in internal phloem associated parenchyma. *Phytochemistry*, 85, 36-43.
- Simon, J.E., Reiss-Bubenheim, D., Joly, R.J., Charles, D.J., 1992. Water Stress-Induced Alterations in Essential Oil Content and Composition of Sweet Basil. *J. Essent. Oil Res.* 4, 71–75.
- Skorić, M., Gligorijević, N., Čavić, M., Ristić, M., Mišić, D., Radulović, S., 2017. Cytotoxic activity of *Nepeta rtanjensis* Diklić and Milojević essential oil and its mode of action. *Ind. Crops Prod.* 100, 163–170.
- Slayter, R. O., 1967. *Plant water relationships*. Academic Press, New York.
- Smith, R.M., Brophy, J.J., Cavill, G.W.K., Davies, N.W., 1979. Iridodials and nepetalactone in the defensive secretion of the coconut stick insects, *Graeffea crouani*. *Journal of Chemical Ecology*, 5(5), 727-735.

- Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, M.G., 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 136-141.
- Sparks, J.T., Bohbot, J.D., Ristić, M., Mišić, D., Skorić, M., Mattoo, A., Dickens, J.C., 2017. Chemosensory Responses to the Repellent *Nepeta* Essential Oil and Its Major Component Nepetalactone by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), a Vector of Zika Virus. *J. Med. Entomol.* 54, 957–963. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx059>
- Stahle, M.I., Kuehlich, J., Staron, L., von Arnim, A.G., Golz, J.F., 2009. YABBYs and the Transcriptional Corepressors LEUNIG and LEUNIG_HOMOLOG Maintain Leaf Polarity and Meristem Activity in *Arabidopsis* *Plant Cell* 21, 3105–3118.
- Stamp, N., 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly review of biology*, 78(1), 23-55.
- Stappen, I., Ali, A., Tabanca, N., Khan, I., Wanner, J., Gochev, V., Singh, V., Lal, B., Jaitak, V., Kaul, V., Schmidt, E., Jirovetz, L., 2015. Antimicrobial and Repellent Activity of the Essential Oils of Two Lamiaceae Cultivated in Western Himalaya. *Curr. Bioact. Compd.* 11, 23–30.
- Stevanović, B., Janković, M. 2001. *Ekologija biljaka sa osnovama fiziološke ekologije biljaka*, NNK International, Beograd. ISBN 86-83635-04-X
- Stevanović, B., Thu, P.T.A., de Paula, F.M., da Silva, J.V., 1992. Effects of dehydration and rehydration on the polar lipid and fatty acid composition of *Ramonda* species. *Can. J. Bot.* 70, 107–113.
- Stojanović, G., Radulović, N., Lazarević, J., Miladinović, D., Đoković, D., 2005. Antimicrobial Activity of *Nepeta rtanjensis* Essential Oil. *J. Essent. Oil Res.* 17, 587–589. doi:10.1080/10412905.2005.9699004
- Sung, P.H., Huang, F.C., Do, Y.Y., Huang, P.L., 2011. Functional expression of geraniol 10-hydroxylase reveals its dual function in the biosynthesis of terpenoid and phenylpropanoid. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4637–4643. doi.org/10.1021/jf200259n
- Suschke, U., Sporer, F., Schneelee, J., Geiss, H.K., Reichling, J., 2007. Antibacterial and cytotoxic activity of *Nepeta cataria* L., *N. cataria* var. *citriodora* (Beck.) Balb. and *Melissa officinalis* L. essential oils. *Natural Product Communications*, 2(12), p.1934578X0700201218.
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Pieczywek, P.M., Rösch, P., Schmitt, M., Popp, J., Zdunek, A., 2016. Raman imaging of changes in the polysaccharides distribution in the cell wall during apple fruit development and senescence. *Planta*, 243(4), pp.935-945.
- Talebi, S.M., Nohooji, M.G., Yarmohammadi, M., Khani, M., 2019. Effect of altitude on essential oil composition and on glandular trichome density in three *Nepeta* species (*N. sessilifolia*, *N. heliotropifolia* and *N. mediterr.*) *Bot.* 40, 81–93.
- Takhtajan, A., 2009. *Flowering plants*. Springer Science & Business Media.
- Tan, H., Xiao, L., Gao, S., Li, Q., Chen, J., Xiao, Y., Ji, Q., Chen, R., Chen, W. and Zhang, L., 2015. TRICHOME AND ARTEMISININ REGULATOR 1 is required for trichome development and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Molecular plant*, 8(9), pp.1396-1411.
- Tarrio, R., Ayala, F.J. and Rodriguez-Trelles, F., 2011. The Vein Patterning 1 (VEP1) gene family laterally spread through an ecological network. *PLoS One*, 6(7).
- Tauxe, R.V., 1991. Salmonella: a postmodern pathogen. *Journal of Food Protection*, 54(7), pp.563-568.

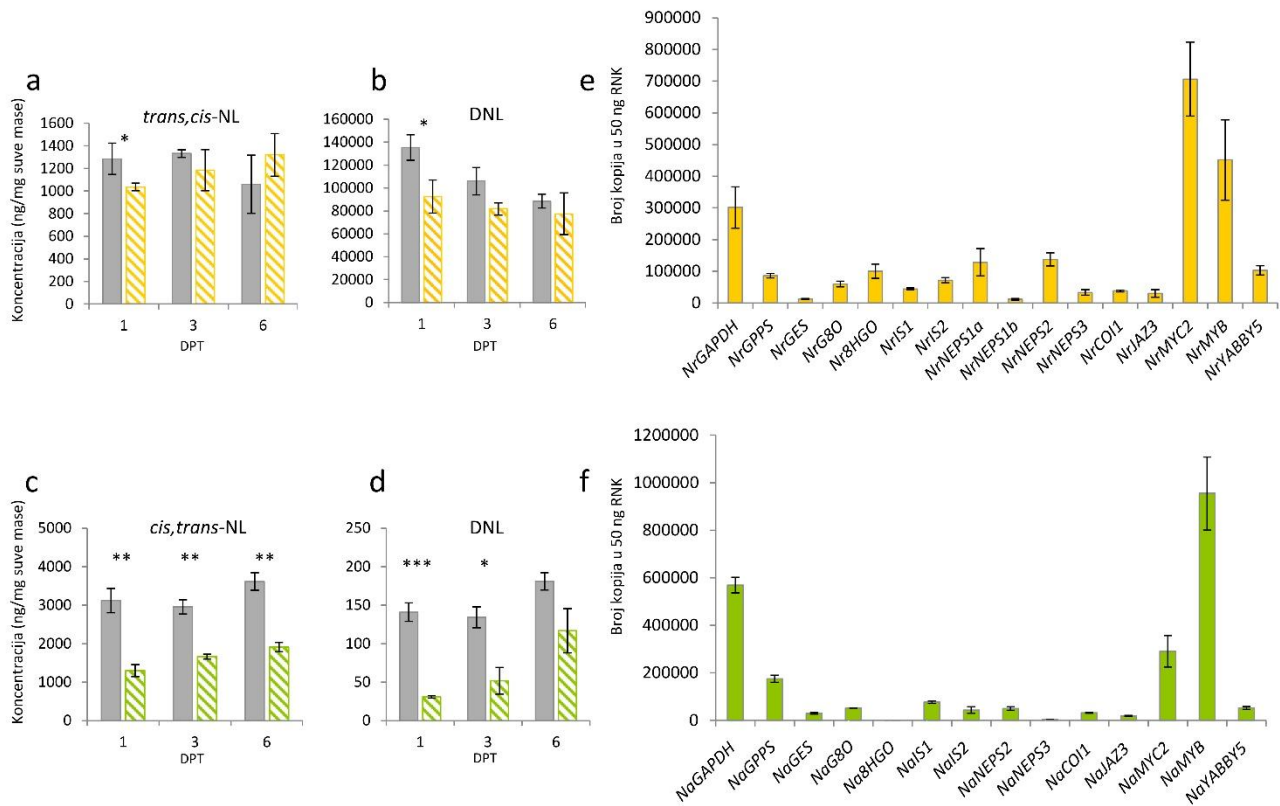
- Thabet, I., Guirimand, G., Guihur, A., Lanoue, A., Courdavault, V., Papon, N., Bouzid, S., Giglioli-Guivarch, N., Simkin, A.J., Clastre, M., 2012. Characterization and subcellular localization of geranylgeranyl diphosphate synthase from *Catharanthus roseus*. *Molecular biology reports*, 39(3), 3235-3243.
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S.S., Vijayakumar, R., 2018. An introductory chapter: secondary metabolites. *Second metab—sources Appl*, 1-21.
- Thaler, J.S., Farag, M.A., Paré, P.W., Dicke, M., 2002. Jasmonate-deficient plants have reduced direct and indirect defences against herbivores. *Ecology Letters*, 5(6), pp.764-774.
- Tholl, D., Kish, C.M., Orlova, I., Sherman, D., Pichersky, E., Dudareva, N., 2004. Formation of Monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* Flowers Involves Heterodimeric Geranyl Diphosphate Synthases Published by: American Society of Plant Biologists (ASPB) Linked references are available on JSTOR for this article : 16, 977–992. doi.org/10.1105/tpc.020156
- Thorn, A., Egerer-Sieber, C., Jäger, C.M., Herl, V., Müller-Uri, F., Kreis, W., Muller, Y.A., 2008. The crystal structure of progesterone 5 β -reductase from *Digitalis lanata* defines a novel class of short chain dehydrogenases/reductases. *Journal of Biological Chemistry*, 283(25), 17260-17269.
- Tissier, A., 2012. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? *The Plant Journal*, 70(1), 51-68.
- Tissier, A., 2018. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *Molecular Pharming: Applications, Challenges and Emerging Areas*, 353-382.
- Trapp, S.C., Croteau, R.B., 2001. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, 158(2), pp.811-832.
- Tsukatani, T., Suenaga, H., Shiga, M., Noguchi, K., Ishiyama, M., Ezoe, T., Matsumoto, K., 2012. Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *Journal of microbiological methods*, 90(3), pp.160-166.
- Turner, G.W., Gershenzon, J., Croteau, R.B., Turner, G.W., Gershenzon, J., Croteau, R.B., 2000. Development of peltate glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.* 124, 665–679.
- Tzakou, O., Harvala, C., Galati, E.M., Sanogo, R., 2000. Essential oil composition of *Nepeta argolica* Bory et Chaub. subsp. *argolica*. *Flavour and Fragrance Journal*, 15(2), 115-118.
- Van Moerkercke, A., Steensma, P., Schweizer, F., Pollier, J., Gariboldi, I., Payne, R., Bossche, R.V., Miettinen, K., Espoz, J., Purnama, P.C., Kellner, F., 2015. The bHLH transcription factor BIS1 controls the iridoid branch of the monoterpene indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(26), 8130-8135.
- Vari, C.E., Dogaru, M.T., Feszt, G., 2001. An experimental study of the antinociceptive effect of some lipophilic iridoids from different species of *Nepeta* genus (Lamiaceae). *FARMACIA-BUCURESTI*, 49(3), 53-64.
- Velasco-Negueruela, A., Perez-Alonso, M.J., Rodriguez, A.B., 1989. Essential oil analysis of *Nepeta teydea* Webb. & Berth. *Flavour Fragr. J.* 4, 197–199. doi.org/10.1002/ffj.2730040409
- Verslues, P.E., Ober, E.S., Sharp, R.E., 1998. Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant physiology*, 116(4), 1403-1412.

- Vujičić, M., Sabovljević, A., Sabovljević, M., 2014. Praktikum iz fiziologije rastenja i razvića biljaka. NKK International, Beograd
- Wagner, G.J., Wang, E. and Shepherd, R.W., 2004. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of botany*, 93(1), p.3.
- Walker, A.R., Marks, M.D., 2000. Trichome initiation in *Arabidopsis*. *Advances in botanical research*, 31, 219-236.
- Wallaart, T.E., Bouwmeester, H.J., Hille, J., Poppinga, L., Maijers, N.C., 2001. Amorpha-4, 11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta*, 212(3), 460-465.
- Waller, G.R., Price, G.H., Mitchell, E.D., 1969. Feline attractant, cis, trans-nepetalactone: Metabolism in the domestic cat. *Science*, 164(3885), 1281-1282.
- Wang, D.H., Du, F., Liu, H.Y., Liang, Z.S., 2010. Drought stress increases iridoid glycosides biosynthesis in the roots of *Scrophularia ningpoensis* seedlings. *J. Med. Plants Res.* 4, 2691–2699. <https://doi.org/10.5897/JMPR09.338>
- Wang, G., Dixon, R.A., 2009. Heterodimeric geranyl(geranyl)diphosphate synthase from hop (*Humulus lupulus*) and the evolution of monoterpene biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 9914–9919. doi.org/10.1073/pnas.0904069106
- Wang, P. and Song, C.P., 2008. Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid. *New Phytologist*, 178(4), 703-718.
- Wang, Q., Reddy, V.A., Panicker, D., Mao, H.Z., Kumar, N., Rajan, C., Venkatesh, P.N., Chua, N.H., Sarojam, R., 2016. Metabolic engineering of terpene biosynthesis in plants using a trichome-specific transcription factor MsYABBY5 from spearmint (*Mentha spicata*). *Plant Biotechnol. J.* 14, 1619–1632. doi.org/10.1111/pbi.12525
- Warnes, G.R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Liaw, W.H.A., Lumley, T., Maechler, M., Magnusson, A., Moeller, S., Schwartz, M., Venables, B., 2016. *ggplots: Various R Programming Tools for Plotting Data*. R package version 3.0.1.
- Wasternack, C., Hause, B., 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* 111, 1021–1058. doi.org/10.1093/aob/mct067
- Weng, J.K., Philippe, R.N., Noel, J.P., 2012. The rise of chemodiversity in plants. *Science*, 336(6089), 1667-1670.
- Wenping, H., Yuan, Z., Jie, S., Lijun, Z., Zhezhi, W., 2011. De novo transcriptome sequencing in *Salvia miltiorrhiza* to identify genes involved in the biosynthesis of active ingredients. *Genomics* 98, 272–279. doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.03.012
- Werker, E., Putievsky, E., Ravid, U., Dudai, N., Katzir, I., 1993. Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Ann. Bot.* 71, 43–59.
- Wilhelm, C., Selmar, D., 2011. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: the physiological limits of improved photosynthesis. *Journal of plant physiology*, 168(2), 79-87.
- Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3-19.
- Wise, M.L., Savage, T.J., Katahira, E., Croteau, R., 1998. Monoterpene synthases from common sage

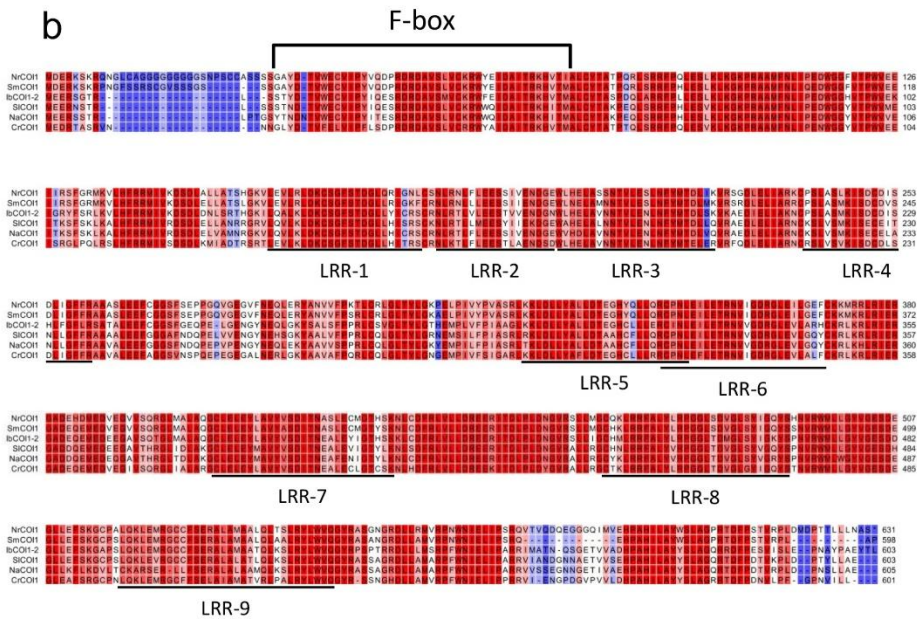
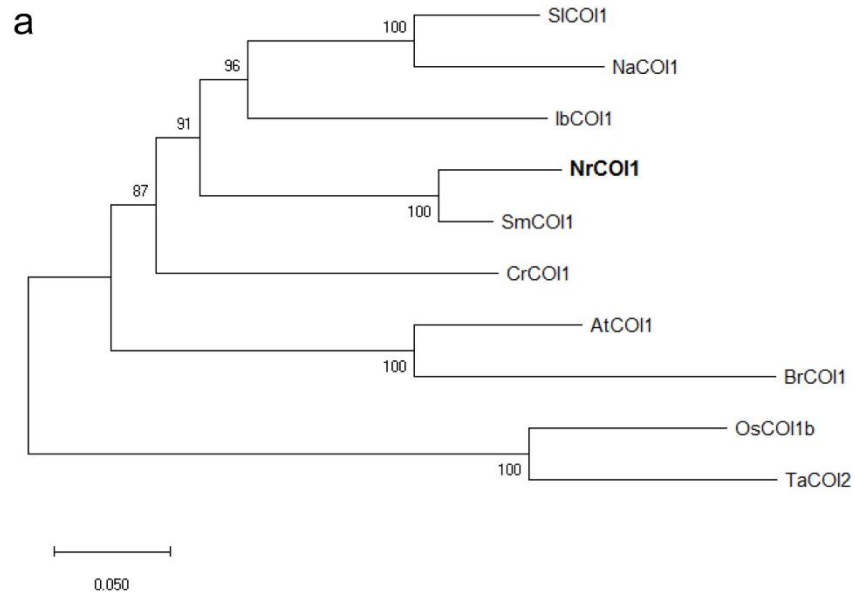
- (*Salvia officinalis*) cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1, 8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 14891-14899.
- Wisecaver, J.H., Borowsky, A.T., Tzin, V., Jander, G., Kliebenstein, D.J., Rokas, A., 2017. A global coexpression network approach for connecting genes to specialized metabolic pathways in plants. *The Plant Cell*, 29(5), 944-959.
- Xiang, B., Li, X., Wang, Yan, Tian, X., Yang, Z., Ma, L., Liu, X., Wang, Yong, 2017. Cloning and Characterization of Two Iridoid Synthase Homologs from *Swertia mussotii*. *Molecules* 22, 1387. doi.org/10.3390/molecules22081387
- Xu, J., van Herwijnen, Z.O., Dräger, D.B., Sui, C., Haring, M.A., Schuurink, R.C., 2018. SIMYC1 Regulates Type VI Glandular Trichome Formation and Terpene Biosynthesis in Tomato Glandular Cells. *Plant Cell* 30, 2988–3005. https://doi.org/10.1105/tpc.18.00571
- Yadav, R.K., Sangwan, R.S., Sabir, F., Srivastava, A.K., Sangwan, N.S., 2014. Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L. *Plant Physiol. Biochem.* 74, 70–83. doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.10.023
- Yan, T., Chen, M., Shen, Q., Li, L., Fu, X., Pan, Q., Tang, Y., Shi, P., Lv, Z., Jiang, W., Ma, Y.N., 2017. HOMEODOMAIN PROTEIN 1 is required for jasmonate-mediated glandular trichome initiation in *Artemisia annua*. *New Phytologist*, 213(3), 1145-1155.
- Yang, Z., et al., *UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: an integrated modeling system*. *Journal of structural biology*, 2012. **179**(3): p. 269-278.
- Yencho, G.C., Renwick, J.A.A., Steffens, J.C., Tingey, W.M., 1994. Leaf surface extracts of *Solanum berthaultii* Hawkes deter Colorado potato beetle feeding. *J. Chem. Ecol.* 20, 991–1007.
- Yeni, F., Yavaş, S., Alpas, H., Soyer, Y., 2016. Most common foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce: a review of recent outbreaks. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(9), 1532-1544.
- Yerger, E.H., Grazzini, R.A., Hesk, D., Cox-foster, D.L., Craig, R., Mumma, R.O., 1992. A rapid method for isolating glandular trichomes. *Plant Physiol.* 99, 1–7.
- Yohannan Panicker, C., Tresa Varghese, H., Philip, D., 2006. FT-IR, FT-Raman and SERS spectra of Vitamin C. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 65, 802–804. doi:10.1016/j.saa.2005.12.044
- Yuan, F., Yang, H., Xue, Y., Kong, D., Ye, R., Li, C., Zhang, J., Theprungsirikul, L., Shrift, T., Krichilsky, B., Johnson, D.M., 2014. OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature*, 514(7522), 367-371.
- Zhang, H., Hedhili, S., Montiel, G., Zhang, Y., Chatel, G., Pré, M., Gantet, P., Memelink, J., 2011. The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of the ORCA genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *The Plant Journal*, 67(1), 61-71.
- Zhang, S., Zhang, L., Tai, Y., Wang, X., Ho, C.T., Wan, X., 2018. Gene discovery of characteristic metabolic pathways in the tea plant (*Camellia sinensis*) using ‘Omics’-based network approaches: A future perspective. *Frontiers in plant science*, 9, p.480.
- Zhao, L., Chang, W.C., Xiao, Y., Liu, H.W., Liu, P., 2013. Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Annual review of biochemistry*, 82, 497-530.

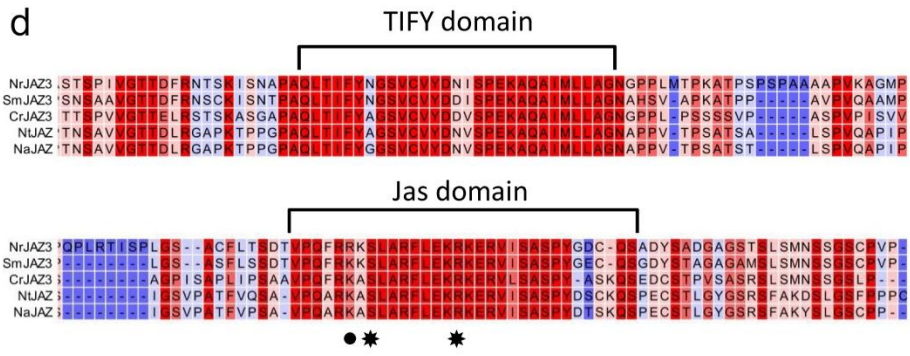
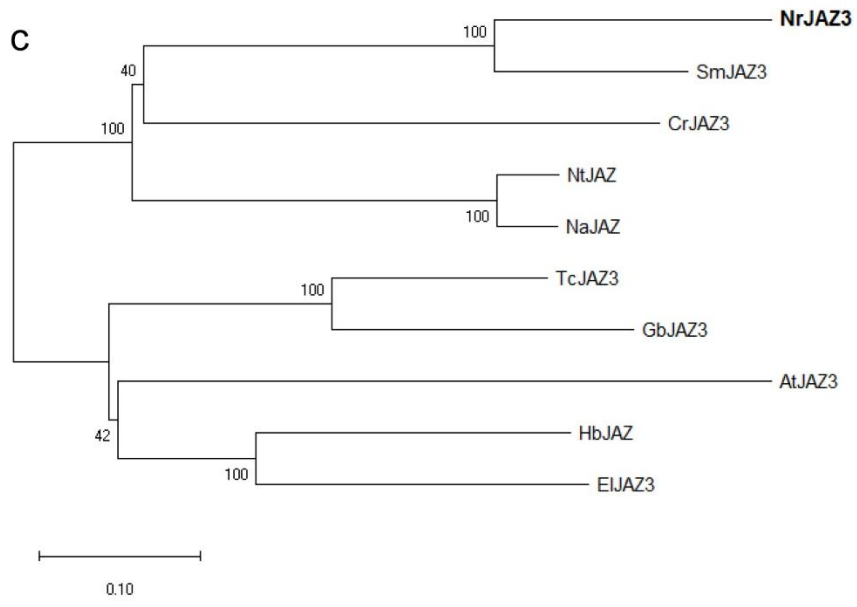
- Zhong, Y.P., Li, Z., Bai, D.F., Qi, X.J., Chen, J.Y., Wei, C.G., Lin, M.M., Fang, J.B., 2018. In Vitro Variation of Drought Tolerance in Five *Actinidia* Species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 143(3), 226-234.
- Zhou, C., Zhang, J., Zhao, S.-J., Hu, Z.-B., 2014. An active *Catharanthus roseus* desacetoxyvindoline-4-hydroxylase-like gene and its transcriptional regulatory profile. *Bot. Stud.* 55, 29. doi.org/10.1186/1999-3110-55-29
- Zhou, M., Memelink, J., 2016. Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism. *Biotechnol. Adv.* 34, 441–449. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.02.004
- Zhu, J.K., 2016. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), pp.313-324.
- Zhu, J.J., Zeng, X.P., Berkebile, D., Du, H.J., Tong, Y., Qian, K., 2009. Efficacy and safety of catnip (*Nepeta cataria*) as a novel filth fly repellent. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(3), 209-216.

8. Prilozi



Slika P1. Kvantifikacija *trans,cis*-NL i DNL u listovima *N. rtanjensis* (a i b) i *cis,trans*-NL i DNL u listovima *N. argolica* subsp *argolica* (c i d). Prikazane su apsolutne vrednosti nakon 1, 3 i 6 dana PEG-tretmana (DPT). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti tri biološka ponavljanja \pm standardna devijacija. Zvezdice (*) označavaju statističke značajnosti između vrednosti netretiranih i tretiranih biljaka (*unpaired t*-test, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$). Skraćenice: COI1 – *Coronatine-insensitive 1*, JAZ3 – *Jasmonate-ZIM domain*, MYC2 – *Mouse-ear cress 2*, MYB – transkripcioni faktor sa MYB domenom, YABBY5 – transkripcioni faktor iz porodice YABBY, GPPS – geranil difosfat sintaza, GES – geraniol sintaza, G8O – geraniol 8-oksidaza, 8HGO – 8-hidroksigeraniol oksidoreduktaza, IS – iridoid sintaza, NEPS – kratkolančana dehidrogenaza bliska nepetalaktolu, GAPDH – gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, DPT – dana PEG tretmana.





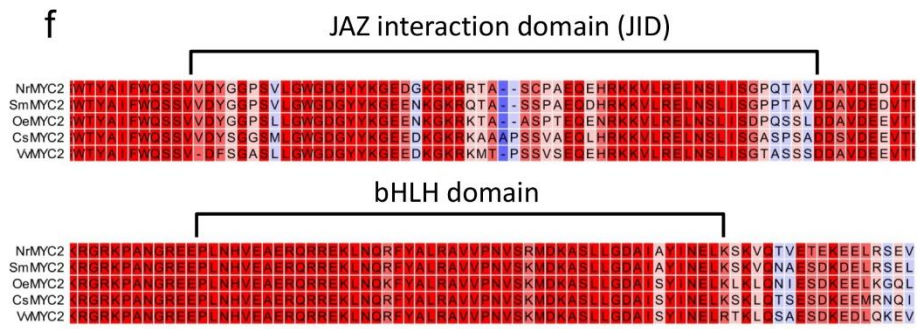
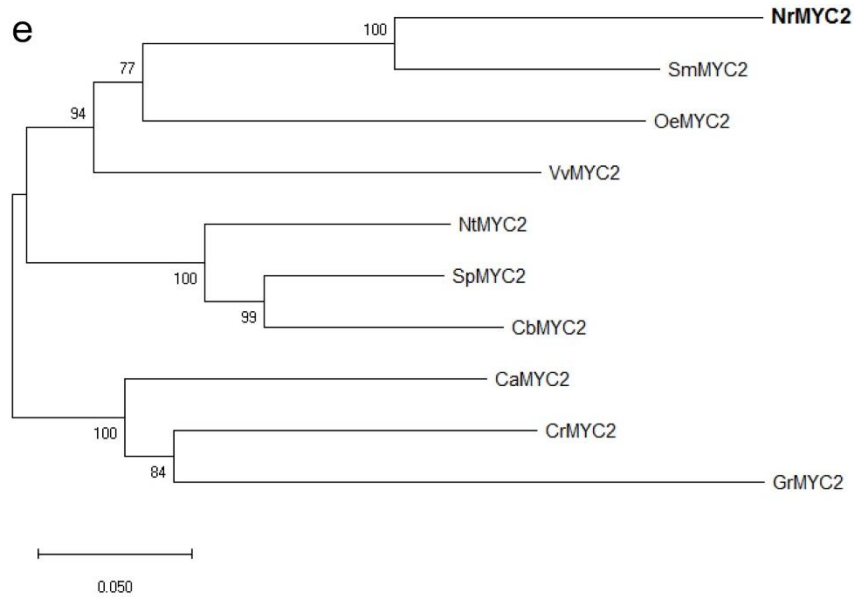


Tabela P1. Spisak proteinskih sekvenci korišćenih u filogenetskim analizama sa opisom funkcije i identifikacionim brojevima

Skraćenica	Vrsta	Funkcija proteina	Identifikacioni broj
NrGPPS	<i>Nepeta rtanjensis</i>	Geranil difosfat sintaza	MN936110
NrGES	<i>Nepeta rtanjensis</i>	Geraniol sintaza	MN936111
NrG8O	<i>Nepeta rtanjensis</i>	Geraniol 8-oksidaza	MN936112
Nr8HGO	<i>Nepeta rtanjensis</i>	8-hidroksigeraniol oksido-reduktaza	MN936113
NrIS1	<i>Nepeta rtanjensis</i>	Iridoid sintaza 1	MN936114
NrIS2	<i>Nepeta rtanjensis</i>	Iridoid sintaza 2	MN936115
NrNEPS1a	<i>Nepeta rtanjensis</i>	Nepetalaktol dehidrogenaza 1	MN936116
NrNEPS1b	<i>Nepeta rtanjensis</i>	Nepetalaktol dehidrogenaza 2	MN936117
NrNEPS2	<i>Nepeta rtanjensis</i>	<i>cis,trans</i> -nepetalaktol sintaza	MN936118
NrNEPS3	<i>Nepeta rtanjensis</i>	Nepetalaktol sintaza	MN936119
NrGAPDH	<i>Nepeta rtanjensis</i>	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	MN936120
NrCOI1	<i>Nepeta rtanjensis</i>	<i>Coronatine-insensitive 1</i>	MN936121
NrJAZ3	<i>Nepeta rtanjensis</i>	<i>Jasmonate-ZIM domain 3</i>	MN936122
NrMYB	<i>Nepeta rtanjensis</i>	MYB– transkripcioni faktor	MN936123
NrMYC2	<i>Nepeta rtanjensis</i>	MYC2– transkripcioni faktor	MN936124
NrYABBY5	<i>Nepeta rtanjensis</i>	YABBY– transkripcioni faktor	MN936125
AmIS	<i>Antirrhinum majus</i>	Iridoid sintaza	ASM61954.1
AmYABBY5	<i>Antirrhinum majus</i>	YABBY- transkripcioni faktor	AAS10178.1
AtCOI1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Coronatine-insensitive 1</i>	OAP07687.1
AtJAZ3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Jasmonate-ZIM domain 3</i>	NP_566590.1
AtPAP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Produkcija pigmenta antocijana 1	NP_176057.1
BrCOI1	<i>Brassica rapa subsp. chinensis</i>	<i>Coronatine-insensitive 1</i>	ADK47027.1
CaMYC2	<i>Coffea arabica</i>	MYC2– transkripcioni faktor	XP_027084635.1
CaIS	<i>Camptotecha acuminata</i>	Iridoid sintaza	AON76722.1
CbMYC2	<i>Capsicum baccatum</i>	MYC2– transkripcioni faktor	PHT58286.1
CcYABBY5	<i>Citrus clementina</i>	YABBY5– transkripcioni faktor izoforma2	XP_006450896.1
CpYABBY5	<i>Chimonanthus praecox</i>	YABBY5– transkripcioni faktor izoforma1	AYO86711.1
CrP5 β R1	<i>Catharanthus roseus</i>	Progesteron-5 β -reduktaza 1	AIW09143.1
CrP5 β R4	<i>Catharanthus roseus</i>	Progesteron-5 β -reduktaza 4	AIW09146.1
CrCOI1	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Coronatine-insensitive 1</i>	ALI87034.1
CrJAZ3	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Jasmonate-ZIM domain 3</i>	ALI87031.1
CrMYC2	<i>Catharanthus roseus</i>	MYC2– transkripcioni faktor	AAQ14332.1
CrIS	<i>Catharanthus roseus</i>	Iridoid sintaza	AFW98981.1
DkMYB4	<i>Diospyros kaki</i>	MYB– transkripcioni faktor	BAI49721.1
DIP5 β R	<i>Digitalis lanata</i>	Progesteron-5 β -reduktaza	AIF73578.1
DpP5 β R	<i>Digitalis purpurea</i>	Progesteron-5 β -reduktaza	ACZ66261.1
ElJAZ3	<i>Euphorbia lathyris</i>	<i>Jasmonate-ZIM domain 3</i>	AVA18024.1
GbJAZ3	<i>Gossypium barbadense</i>	<i>Jasmonate-ZIM domain 3</i>	ATG31092.1
GrMYC2	<i>Gentiana rigescens</i>	MYC2- transkripcioni faktor	AIA22170.1
HbJAZ	<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>Jasmonate-ZIM domain 3</i>	AJC52330.1
HiMYB	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	MYB- transkripcioni faktor	PIN00955.1
IbCOI1	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>Coronatine-insensitive 1-2</i>	AMS24679.1

JcYABBY5	<i>Jatropha curcas</i>	YABBY5– transkripcioni faktor	XP_012078813.1
LjIS	<i>Lotus japonicus</i>	Iridoid sintaza	AMB61018.1
McIPDH	<i>Mentha canadensis</i>	(-)-izopiperitenol dehidrogenaza	ABR15424.1
MdYABBY5	<i>Malus domestica</i>	YABBY5– transkripcioni faktor	NP_001281031.1
MpIPDH	<i>Mentha piperita</i>	(-)-izopiperitenol dehidrogenaza	ABW86883.1
MpP5βR	<i>Mentha piperita</i>	Progesteron-5β-reduktaza	ADG46022.1
MpYABBY5	<i>Mucuna pruriens</i>	YABBY5– transkripcioni faktor	RDY01937.1
MsMYB	<i>Mentha spicata</i>	R2R3-MYB transkripcioni faktor	AQR58379.1
MsYABBY5	<i>Mentha spicata</i>	YABBY5– transkripcioni faktor	AMA07776.1
NaCOI1	<i>Nicotiana attenuata</i>	<i>Coronatine- insensitive 1</i>	ABK27928.1
NaJAZ	<i>Nicotiana attenuata</i>	<i>Jasmonate-ZIM domain 3</i>	AFL46170.1
NcIS1	<i>Nepeta cataria</i>	Iridoid sintaza 1	ASM62109.1
NcIS2	<i>Nepeta cataria</i>	Iridoid sintaza 2	ASM62110.1
NmIS1	<i>Nepeta mussinii</i>	Iridoid sintaza 1	ASM62111.1
NmIS2	<i>Nepeta mussinii</i>	Iridoid sintaza 2	ASM62112.1
NmNEPS1	<i>Nepeta mussinii</i>	Nepetalaktol dehidrogenaza 1	AXF35971.1
NmNEPS2	<i>Nepeta mussinii</i>	<i>cis,trans-nepetalaktol sintaza</i>	AXF35972.1
NmNEPS3	<i>Nepeta mussinii</i>	Nepetalaktol sintaza	AXF35973.1
NtJAZ	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Jasmonate-ZIM domain 7b</i>	AGU37277.1
NtMYC2	<i>Nicotiana tabacum</i>	MYC2– transkripcioni faktor	NP_001313001.1
OeIS	<i>Olea europaea</i>	Iridoid sintaza	ALV83438.1
OeMYC2	<i>Olea europaea var. sylvestris</i>	MYC2– transkripcioni faktor	XP_022881109.1
OpMYB	<i>Ophiorrhiza pumila</i>	MYB– transkripcioni faktor	BAU61355.1
OsCOI1b	<i>Oryza sativa</i>	<i>Coronatine- insensitive 1-homlog 1b</i>	XP_015639870.1
PcSCAD	<i>Perilla citriodora</i>	Kratkolančana alkoholna dehidrogenaza	AHH81852.1
PfSCAD	<i>Perilla frutescens</i>	Kratkolančana alkoholna dehidrogenaza	AHH81853.1
PpYABBY5	<i>Prunus persica</i>	YABBY5– transkripcioni faktor	XP_007202630.1
RgMYB	<i>Rehmannia glutinosa</i>	R2R3-MYB transkripcioni faktor	AKV71940.1
RoP5βR	<i>Rossmarinus officinalis</i>	Progesteron-5β-reduktaza	JQ894868.1
SiYABBY5	<i>Sesamum indicum</i>	YABBY5– transkripcioni faktor	XP_011078402.1
SICOI1	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Coronatine- insensitive 1</i>	NP_001234464.1
SmCOI1	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	<i>Coronatine- insensitive 1</i>	ARB15806.1
SmJAZ3	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	<i>Jasmonate-ZIM domain 3</i>	AHK23660.1
SmMYB111	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Transkripcioni faktor	ASV64719.1
SmMYC2	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	MYC2– transkripcioni faktor	AIO09733.1
SmPAP1	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	PAP1– transkripcioni faktor	ACZ48688.2
SpMYC2	<i>Solanum pennellii</i>	MYC2– transkripcioni faktor	XP_015085364.1
SsSCAD1	<i>Salvia splendens</i>	Kratkolančana alkoholna dehidrogenaza 1	TEY48388.1
SsSCAD2	<i>Salvia splendens</i>	Kratkolančana alkoholna dehidrogenaza 2	TEY48402.1
TaCOI2	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Coronatine- insensitive 2</i>	ADK66974.1
TcJAZ3	<i>Theobroma cacao</i>	<i>Jasmonate- ZIM domain 3, izoforma 1</i>	EOY21395.1
TsP5βR	<i>Thymus serpyllum</i>	Progesteron-5β-reduktaza	JX914656.1
VbMYB	<i>Vitis bellula</i>	MYB– transkripcioni faktor	AFG28178.1
VvMYC2	<i>Vitis vinifera</i>	MYC2– transkripcioni faktor	RVW49978.1
VvYABBY5	<i>Vitis vinifera</i>	YABBY5– transkripcioni faktor	XP_002285328.1

Biografija autora

Neda A. Aničić je rođena 11.7.1989. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i IX beogradsku gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2008. godine na smeru Ekologija. Diplomirala je 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,9, a master studije je završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,9. Doktorske studije je upisala školske 2013/2014. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Ekologija, modul Ekologija biljaka i fitogeografija. Od novembra 2013. godine radi kao istraživač pripravnik u Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” i učesnica je projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja republike Srbije iz programa osnovnih istraživanja pod nazivom: „Fiziološka, hemijska i molekularna analiza diverziteta retkih i ugroženih biljnih vrsta u cilju *ex situ* zaštite i produkcije biološki aktivnih jedinjenja” (OI173024). Od juna 2019. godine Neda Aničić je učesnica *COST* akcije *CA18210 RoxyCOST*. Zvanje istraživač saradnik stiče u martu 2015. godine. Autor ili koautor je na 10 naučnih radova u međunarodnim časopisima, kao i na 10 saopštenja sa skupova međunarodnog i 4 saopštenja sa skupova nacionalnog značaja.

Neda Aničić je dobitnica stipendije projekta *COST action FA1106 QualityFruit* za stručno usavršavanje na Aristotelovom Univerzitetu u Solunu u Grčkoj (2015. godine). Član je Društva za fiziologiju biljaka Srbije (DFBS) i međunarodnog udruženja *The Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB)*. Dobitnica je nagrade za treće mesto za najbolju poster prezentaciju na simpozijumu međunarodnog značaja *2nd International Conference on Plant Biology, 21th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society* (jun 2015.), u okviru koje je prezentovala deo rezultata iz doktorske disertacije.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Неда А. Аничих _____

Број индекса _____ Е3006/2013 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Метаболизам непеталактона у листовима одабраних врста рода *Nepeta* (Lamiaceae) и његова регулација током дехидратације

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Неда А. Аничих _____

Број индекса _____ Е3006/2013 _____

Студијски програм _____ Екологија; Екологија биљака и фитоегеографија _____

Наслов рада **Метаболизам непеталактона у листовима одабраних врста рода *Nepeta* (Lamiaceae) и његова регулација током дехидратације**

Ментор _____ др Тамара Ракић _____

Потписани/а _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Метаболизам непеталактона у листовима одабраних врста рода *Nepeta* (Lamiaceae) и његова регулација током дехидратације

која је моје ауторско дело.

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

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

① Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.