

## VEÇORI TË ORGANIZIMIT GJENOMIK, KONTROLLIT TË TRANSKRIPTIMIT DHE ANALIZËS FUNKSIONALE TË MTP NË SPECIE TË NDRYSHME BIMORE (REVIEW)

\*STELA PAPA, ARIOLA BACU.

Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, Departamenti i  
Bioteknologjisë

### Përmbledhje

Mijëra lloje terpenesh janë gjetur në mbretërinë bimore, por secila specie është e aftë të prodhojë vetëm një numër të kufizuar të tyre. Acetil CoA i njohur ndryshe si acidi acetik aktiv është molekula prekursorë për sintezën e terpenëve. Për vite të kuptuarit e mekanizmeve përgjegjëse për shumëllojshmërinë e këtyre komponimeve ka nxitur studiuesit të eksplorojnë organizimin e gjeneve përgjegjëse për enzimat rregullatore të rrugëkalimit terpenoidik, dhe mundësitë e modifikimeve post-transkripcionale dhe postranslacionale të lidhura me to. Gjenet që kodojnë për monoterpen-sintetazat mund të jenë nga një deri në disa në varësi të specieve bimore. Raportimet flasin për zbulime mbi veçori të sintezës, maturimit dhe strukturës së monoterpen-sintetazave në kategori të ndryshme bimore. Po ashtu, studimi i lidhjes ndërmjet biosintezës së MTP dhe dëmtimeve mekanike, fizike apo patogjenëve është marrë në konsideratë duke dhënë vlerësime mbi shprehjen e gjeneve nën ndikimin e kushteve të posaçme.

**Fjalëkyçe:** MTPs, cDNA, modifikim post-transkripcional, analizë funksionale

### Abstract

Thousands of different types of terpenes are discovered in plant kingdom, each species being capable to synthesize a limited number of them. CoA acetyl, known as active acetic acid is the precursor molecule for terpene synthesis. For years, understanding responsible mechanisms for synthesis of a variety of these components, has promoted studies that address organization of genes coding for regulatory enzymes of terpenoid's pathway, and either post-transcriptional, or post-translational modifications of them. Genes coding for monoterpene synthases can vary from one to several, depending on plant species. Reports describe discoveries on synthesis, maturation and structure of monoterpene-synthases in different plant categories. The correlation of MTP synthesis with mechanical, physical, and pathogenic injuries has been connected to gene expression under special environmental conditions.

**Keywords:** MTPs, cDNA, post-transcriptional modification, functional analysis

### Hyrje

Terpenet janë grupi më i madh i produkteve natyrore bimore, i cili përfshin së paku 30,000 përbërës (Connolly & Hill, 1991), i krijuar nën veprimin e terpen sintetazave (TPSs) si enzimat primare përgjegjëse për rrugëkalimin terpenoidik. Bazuar në sekuencat e aminoacideve, TPS ndahen në gjashtë nënfamilje, TPS-a deri TPS-f dhe kanë origjinë evolucionare nga një substrat i vetëm (Bohlmann *et al.*, 1998). Sot njihen skeletet karbonike të qindra terpenëve të ndryshme (Aubourg *et al.*, 2002; Dudareva *et al.*, 2003; Tholl,

2006a); monoterpeneve (C10) (Dewick, 1999), sesquiterpeneve (C15) (Fraga, 2006), diterpeneve (C20) (Hanson, 2000) dhe triterpeneve (C30) (Connolly & Hill, 2005). Këta katalizatorë konvertojnë prenil difosfatet aciklike dhe skualenet në forma të ndryshme ciklike dhe aciklike. Biosinteza e terpeneve (Wise & Croteau, 1999; Cane, 1999) dhe në veçanti e monterpeneve (Davis & Croteau, 2000; Tholl, 2006; Christianson, 2006) është studiuar në detaje tashmë, por ende vijon puna për të kuptuar kujt i dedikohet larmia e këtyre produkteve. Monoterpenet janë klasa më e thjeshtë e terpenoideve, të cilat përmbajnë vetëm 10 atome karboni, zakonisht prezente në vajrat esenciale të bimëve. Ato e kanë prejardhjen nga difosfati i izopentenilit (IPP) dhe izomerit alelik të dimetilalil di fosfatit (DMAPP). Tek bimët, ky prekursor qëndror sintetizohet në plaste. Monoterpene sintetazat (ciklizat) janë enzimat kyçe në biosintezën e monterpeneve (Croteau, 1987) pasi ato kanalizojnë ciklimin e geranil difosfat (GPP/GDP), i cili është ndërmjetësi i biosintezës së izoprenoideve universale aciklike (C10) në skeletet specifike të monterpeneve (El Tamer *et al.*, 2003; Schwab *et al.*, 2001).

Me sa duket, numri i madh i TP i dedikohet jo vetëm shumëllojshmërisë së enzimave përgjegjëse për biosintezën e tyre, por edhe aftësisë së këtyre katalizatorëve për të formuar produkte shumëfishe nga një substrat i vetëm. Kështu, një nga klonet e para të monterpen-sintetazave, sabinene sintetaza nga *Salvia officinalis*, prodhonte 63% (+) sabinene, 21%  $\nu$ -terpinene, 7.0% terpinolen, 6.5% limonen dhe 2.5% mircen (Wise *et al.*, 1998). Kjo tregon se kjo klasë enzimash mund të kenë mekanizma unike për të kontrolluar ciklet e karbokationeve. Raportimet mbi kapacitetin e një terpen-sintetaze të vetme për të prodhuar produkte shumëfishe shpesh lidhen me veçoritë e gjeneve të tyre koduese. Vitet e fundit një numër gjenesesh të këtij lloji janë klonuar dhe karakterizuar nga specie të kategorive të gjimnospermëve dhe angjospermëve, sherebela (Wise *et al.*, 1998), koniferet (*Abies grandis* dhe *Taxus brevifolia*) (Trapp & Croteau, 2001), hardhia (*Vitis vinifera*) (Martin dhe Bohlmann, 2004), çaji (*Melaleuca alternifolia*) (Shelton *et al.*, 2004), mandarina (*Citrus unshiu*) (Shimada *et al.*, 2004; Shimada *et al.*, 2005), etj.

Një bimë, e cila prodhon një gamë të gjerë monterpenesh është *Salvia officinalis*. Për të karakterizuar MTP-të tek kjo bimë, fillimisht Mitchel L. (1998) hartoi një strategji të bazuar në PCR për të izoluar gjenet përgjegjëse. U vu re se cADN-ja kodonte për disa enzima njëherësh. Kur ky fragment shprehej tek *Eschericia coli* prodhonte një grup enzimash si bornil difosfati përgjegjës për sintezën e 1,8-kubeikenit dhe sabinenit,  $\alpha$  pienenit, kamfenit dhe limonenit; Ndërsa 1, 8-kineol sintetaza prodhonte sasi të njëjta të (+) dhe (-)  $\alpha$ pinenit, (+) dhe (-) $\beta$  pinenit, mikrenit dhe sabinenit; Sabinen sintetaza prodhonte sasi të barabarta të  $\gamma$ -terpenit dhe terpinolenit. Të tre këto enzima kodohen nga e njëjta sekuencë cADN-je e inxhinieruar në *E. coli*, por dikur e pranishme në bimë. Bohlmann, (1988) përdori primera të dizenuar bazuar mbi rajone koduese të monterpen sintetazave tek bredhi (*Abies grandis*). Amplikoni prej 300çb u përdor si prob hibridizues, i cili çoi në 4 fragmente

të ndryshme cADN-je nga qelizat e bredhit. Libraria e cADN-së, e krijuar në këtë mënyrë, kodonte për katër monoterpen sintetaza të ndryshme. Shprehja në *Escheria coli* e ndjekur nga analiza enzimatike në prani të geranil difosfatit (C10), farnesil difosfatit (C15), dhe geranilgeranildifosfatit (C20) dhe rezultatet e GC dhe MS, konfirmuan se këto sekuenca kodojnë për katër monoterpen sintetaza të reja, (-)-kamphen sintetazën, (-) beta-felandren sintetazën, terpinolen sintetazën dhe një enzimë, e cila prodhon (-)-limonenin dhe (-)-alpha-pinenin. Analizat e sekuencave aminoacidike treguan se këto enzima, të cilat përmbajnë 618 deri në 637 aminoacide (71-73 kDa) dhe translatohen si pre-proteina, përmbajnë një aminoacid terminal “plastid targeting sequence 50-60 U”. Largimi i një fragmenti të shkurtër nga cADN-ja u vu re se lejonte shprehjen e formave “pseudomature”. Nga krahasimi i sekuencave u vu re se këto monoterpen sintetaza të reja, tek bredhi janë anëtare të subfamiljes Tps-d dhe ngjajnë me seskuiterpen sintetazën (C15) dhe diterpen sintetazën (C20) e konifereve. Në vitin 2011 Falara në studimin e saj për *Solanum lycopersicum* vërtetoi se gjenoma e domates ka 44 gjene përgjegjëse për terpen sintetazat (TPS), nga të cilat 29 janë funksionale. Nga këto 26 shprehen në të paktën disa organe ose inde të bimës. Gjenet koduese për MTP veçohen nga ato të terpenoideve të tjera dhe ndahen në tre klasa: TPS-b, TPS-g dhe TPS-e/f.

Soja është një tjetër bimë e pasur me MTP. Man Zhang (2013) raportoi identifikimin e një gjeni të ri (*GmNES*) kloroplastik nga farat e sojës, i cili kodon për nerol sintetazën. Izolimi i monoterpen-sintetazave (MTP) si klasë e terpen-ciklazave është studiuar nga autorë të ndryshëm. E para monoterpen-sintetazë e prodhuar *in vitro* ka qenë limonen-sintetaza tek *Mentha spicata*, e klonuar dhe sekuencuar nga Savage, (1993). Më pas (Savage, 1994) studioi *Pinus contorta* për identifikimin e enzimës dhe përbërjen e aminoacideve. Një ekstrakt “cell free” nga ksilema e *Pinus contorta* u evidentua se katalizonte shndërrimin e geranil pirofosfatit në një monoterpen alkalik (i pranishëm në oleoresinën e pishës). Më pas, u kuptua se enzima përgjegjëse vepronte në mënyrë të ngjashme me terpenoid-ciklazat e bredhit (*Abies grandis*) dhe të bimëve të larta. Megjithatë, antitruapat specifike për limonen-sintetazën e angiospermëve, nuk dedektuan praninë e limonen-sintetazës në këtë ekstrakt, as tek pisha edhe as tek bredhi. Mendohet se monoterpen-sintetazat e izoluara nga koniferet mund të kenë renditje aminoacidesh të ndryshme edhe në sitet aktive, krahasuar me ato të angiospermëve.

Një evolucion të mirëfilltë solli analizimi në 1999, i monoterpeneve tek *Quercus ilex* L. dhe bimët transgjenike të *Betula pendula* Roth, nga Bohlmann. Izopreni (C5) është elementi më i emetuar nga bimët, i pasuar nga monoterpenet (C10). Disa specie bimore i ruajnë monoterpenet në struktura të specializuara (koniferet, *Lamiaceae*), të tjera si p.sh lisi (*Quercus ilex* L.) nuk kanë struktura për ruajtje. Bohlmann (1999) izoloi dhe karakterizoi monoterpen sintetaza nga *Quercus ilex* L. 24 cADN u analizuan me RFLP dhe u klasifikuan në 5 grupe bazuar në hartën restriktive. Dy prej

kloneve të izoluar u shprehën tek *E. coli* nga ku u vu re se njëri kodonte për multiprodukt të panjohur të kategorisë së monoterpen sintetazave, i cili katalizonte formimin e  $\alpha$ -pinenit (41.2 %), sabinenit (34.3 %) dhe  $\beta$ -pinenit (24.5 %); ndërsa kloni i dytë i emërtuar QiPINS përbënte një sekuencë të plotë koduese, e cila është paraqitur në EMBL me kodin AM283099. Bazuar në sekuencën e tij QiPINS u klasifikua në subfamiljen Tps-b (Bohlmann *et al.*, 1998). Kjo enzimë përmban rajonet e pranishme në shumicën e monoterpen sintetazave, të cilat janë mbetjet e argininave dyfishe (RRX8E) në fundin N-terminal dhe të pasura me aspartat (DDXXD) në qendrën aktive. Luckner *et al.*, (2002) studioi monoterpen sintetazat tek limoni (*Citrus limon*), meqënëse ai përmban një numër të madh MTP të gjendura sidomos në lëvore. Gjetet përgjegjëse për prodhimin e monoterpen sintetazave u izoluan, sekuencuan dhe cADN u shprehën në mënyrë funksionale tek *E. coli*.

Produktet kryesore të enzimave në testet me geranil difosfat si substrat ishin limonen sintetaza, beta-pinen sintetaza dhe gamma terpinenin sintetaza. Të katërta llojet e enzimave për prodhimin e 10-17 monoterpeneve zakonisht të vëzhguara tek limoni, korrespondojnë me më shumë se 90% të produkteve të pranishme (Luckner, *et al.*, 2002). Në 2004, Shelton studioi monoterpen sintetazat tek *Melaleuca alternifolia*, një pemë australiane e njohur për vajin e pasur me MTP. Ai krijoi një librari klonale cADN-je dhe 500 sekuenca të shprehura (ESTs) u sekuencuan. Shprehja heterologe e gjeneve tek *E. coli* dhe analiza e sekuencave dhe enzimave rekombinante nuk dha një produkt të terpinen-4-ol-it, pjesa më e madhe përbërëse e vajit të kësaj peme, ndaj u gjykua se nisur nga natyra racemike linalooli mund të mos kishte orgjinë enzimatike. Në vitin 2004 Shimada T. izoloj katër cADN tek mandarina (*Citrus unshiu* Marc), të cilat përmbanin gjenet për monoterpen sintetazat (CitMTSE1, CitMTS3, CitMTS61, dhe CitMTS62). Nga testet *in vitro* u demonstrua se ato kodonin për d-lemonen sintetazën, gama-terpen sintetazën,  $\gamma$ -terpen sintetazën dhe  $\beta$ -pinen sintetazën, përkatësisht. Shprehja e mRNA e shumicës së kloneve ishte aktive në fazat e para të zhvillimit të frutit. CitMTSE1 dhe CitMTS3 u shprehën gjithashtu edhe gjatë periudhës së lulëzimit duke treguar se kishin një mekanizëm rregullimi të ndryshëm. Fahrnich (2011) studioi MTP tek speciet *Nicotiana*, meqë ato kanë karakteristikë të emetojnë komponentë aromatike bimorë të të ashtuquajturës "Cineole cassette", që përbëhen nga 1,8- cineoli, limoneni, myrceni,  $\alpha$ -pineni,  $\beta$ -pineni, sabineni dhe  $\alpha$ -terpineoli. U izoluan gjenet tek *Nicotiana glauca* dhe *Nicotiana glauca* së bashku me enzimat koduese, të cilët prodhonin monoterpene karakteristike. Sekuencat aminoacidike të dy terpen sintetazave janë përcaktuar 99%. Në familjen *Lamiaceae* (*Labiatae*) gjenden disa monoterpen sinteza, përfshirë linalool dhe limonen sintetazën, të cilat janë klonuar dhe përcaktuar funksionalisht në disa bimë të familjes *Labiatae*. Saeidnia (2014) përcaktoi praninë e linalool dhe limonene sintetazës në katër specie të familjes *Labiatae* përfshirë *Nepeta cataria*, *Lavandula angustifolia*, *Hyssopus officinalis*, dhe *Salvia sclarea* duke përdorur teknika të

bioteknologjisë molekulare së bashku me analizat “Head space SPME-GC-MS” për të përcaktuar aromën e këtyre specieve.

Monoterpenet si produkte të metabolizmit sekondar kanë për funksion mbrotjen e bimës nga dëmtimet mekanike dhe insektet invazive, ndaj transkriptimi dhe translrimi i gjeneve përgjegjës për to rritet sidomos pas dëmtimeve mekanike. Gjithashtu, monoterpen sintetazat janë rregullatorë të transkriptimit për gjene të tjerë, si gjenet përgjegjës për sintezën e seskuiterpeneve apo diterpeneve. Steele (1998) studioi kontrollin e transkriptimit të monoterpen sintetazave tek *Abies Grandis* në nivel gjenik duke përdorur probe të shënuara. Në pamje të parë, dukej se sinteza e të gjitha klasave të sintetazave ndodhte njëkohësisht. Sidoqoftë, pas studimeve të mëtejshme u vu re se monoterpen sintetazat sintetizohet më herët, rreth 6 deri në 48 orë.

Nga analizat e ARN-së u vu re se gjenet koduese të të tre klasave të enzimave aktivizoheshin si përgjigje ndaj dëmtimeve, dhe se monoterpen sintetazat shërbenin si rregullues transkriptimi (transkriptimi i monoterpen sintetazave u vu re 2 orë pas dëmtimit). Terra, (2013) përshkroi shprehjen dhe karakterizimin funksional të cADN-së koduese për monoterpen-sintetazat tek *Coffea arabica*. Përbërja kimike e pijes së kafes është mjaft komplekse duke qënë se është e përbërë nga qindra komponentë volatilë dhe jo volatilë shumica e të cilëve formohen gjatë procesit të pjekjes. ARN-ja u ekstraktua nga lulet, farat dhe frutat e *C. arabica* (cv. Cutai Red) në katër fazat e pjekjes. U analizua shprehja e gjeneve në inde të ndryshme dhe në faza të ndryshme të zhvillimit dhe pas shprehjes heterologe të këtyre proteinave në *E. coli*, u krye analizimi i aktivitetit enzimatik në kultura *in vitro*, duke inkubuar proteinat rekombinante me geranil pirofosfat (GPP), geranilgeranil pirofosfat (GGPP) dhe farnesil pirofosfat (FPP), prekursorë respektivisht të mono-, di- dhe seskuiterpeneve.

Një aspekt tjetër shumë i rëndësishëm është se monoterpenet bimore janë pjesë e metabolitëve sekondarë, që ndërmjetësojnë ndërveprimet biotike dhe abiotike duke dhënë efekt të drejtpërdrejtë në përshtatjen e bimës. Për të vërtetuar këtë dhe hipotezën se diversiteti i monoterpeneve është i lidhur me diversitetin funksional për shkak të dublikimit të gjeneve, u kryen studime nga Zapata (2013). Ai rindërtoi historinë evolutive të monoterpen sintetazave (TPSb) tek speciet *Protium*, si edhe ndryshimet taksonomike e kimike në gjininë e pemëve tropikale. U izoluan kopje shumëfishe të gjeneve TPS-b nga specie *Protium* dhe u rikrijua filogjeneza e kësaj familje gjenike. Studimi rezultoi në gjetjen e provave se për një specie të lashtë dhe për një të vonët, ngjaret e dublikimit kanë çuar në formimin e 3 deri në 5 kopje të gjeneve TPSb tanimë të pranishëm në *Protium*.

Në 2014, midis studimeve mbi MTP-të spikatën dy, njëri mbi *Eleutherococcus trifaliatus* nga Kulheim dhe tjetri mbi xhenxhefilin (*Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr nga Saoealuck Bua-in.

U përcaktua një fragment përgjegjës për monoterpen sintetazën tek *E. trifolius* duke përdorur një çift primerash degjenerativë (C. Külheim, 2014). Pas amplifikimit të fundeve të cADN-së (5'-3'RACE) u përcaktua vargu i plotë i ADN-së. Gjeni i zbuluar *EtLIM* përmban një ORF prej 1752 bp me një masë molekulare 67.3 kDa dhe shprehet në gjetet e reja, trupin e bimës dhe në frut. Produkti i gjenit *EtLIM* është identifikuar me gas kromatografi/ mass spektrometri (GC/MS) si limonen.

Xhenxhefili është një tjetër bimë me përmbajtje të lartë të terpenoideve në vajin e tij. Për këtë arsye është studiuar shprehja e gjeneve për MTP dhe mënyra sesi dëmtimet mekanike mund të influencojnë në transkriptimin e tyre. Një transkript i ZMM1 u detektua pothuajse vetëm në gjetet dhe çlirohet mbas dëmtimit të tyre. *Salvia officinalis*, një nga bimët më të rëndësishme për industrinë farmaceutike është e pasur në vajra esenciale të prodhuara nga gjetet e reja, që përbëhen nga monoterpenet 1,8 kineol,  $\alpha$ -thujoni,  $\beta$ -thujoni dhe kamfuri (produkte të 1,8- kinol sintetazës, (+) -sabinen sintetazës dhe (+) – bronil difosfat sintetazës, përkatësisht) (Mitchel *et al.*, 1998). Këto monoterpenë prodhohen dhe ruhen në gjëndrat epidermale. Studime të mëtejshme janë kryer tek *Salvia officinalis* nga Grausgruber-Gröger, (2012) për ndikimin sezonal në shprehjen e gjeneve për monoterpen sintetazat. Rezulton se për të gjitha monoterpen sintetazat dhe monoterpenet prania dhe sasia vareshin nga kultivari dhe koha e vlerësimit. Në nivel transkriptimi terpen sintetazat tregonin një maksimum në mes të periudhës vegetative dhe më pas rënie;

Studimi i biosintezës dhe emetimit të monoterpeneve nga stimulimi prej të ushqyerit të herbivorëve, ishte një tjetër drejtim i rëndësishëm studimor për njohjen e faktorëve, që ndikojnë në sintezën e monoterpeneve. Eksperimentet e kryera në kushte të kontrolluara në laborator, në sera dhe në fushë, për të testuar se si metil jasmonati (MeJA) ose dëmtimet do të ndikonin në shprehjen e gjeneve koduese të MTPS dhe përqëndrimin dhe emetimin e MTP, treguan se MeJA luan rolin e represorit tek *Quercus ilex* L.

Meqënëse bredhi përbën një sistem model për studimin e dëmtimeve të induktuara tek koniferët, si për shembull përgjigjen ndaj sulmit të insekteve, kjo specie vijoi të studiohej nga një numër kërkuesish ndër vite. Oleoresina, e cila është një përzierje terpenesh (85% monoterpenë, 15% seskuiterpenë) dhe rosine (diterpen dhe resinë), që çlirohet gjatë dëmtimeve është toksike për insektet invaduese dhe në këtë mënyrë shmang efektin e tyre patogjenik.

Përpjekje të ndryshme janë bërë për të rritur prodhimin terpenoidik përmes inxhinierimit të metabolitëve (Cheng *et al.*, 2007). Studime të tilla datojnë që në 1998 (Bohlmann) kur *Bentula pendula* Roth një emetues i dobët i monoterpeneve u transformua me një fragment kodues (QiMYRS) të mikren sintetazës i marrë nga *Quercus ilex* L. Linjat transgjenike u rigjeneruan dhe u testuan në nivel ADN-je dhe ARN-je. Mungesa e transkriptimit të QiMYRS u vëzhgua në linjat transgjenike, ndërkohë që transkriptimi i gjenit *nptII* sillte inaktivizimin e transgjenit. Dy ishin arsyet e supozuara të këtij

inaktivizimi, njëra mundësia e metilimit të promotorit 35S dhe tjetra e lidhur me rajonin N-terminal. Kur transgjenikët u testuan me mass spectrometry (PTR-MS) u vu re se nuk shfaqnin emetim monoterpenesh. Fenomeni i heshtjes së gjeneve tek transgjenikët, i njohur si PTGS ose RNAi është i njohur, dhe i raportuar në mjaft publikime që shpjegojnë mekanizma të mundshëm të heshtjes bazuar në aktivizimin e sistemit enzimatik që përdor siARN. Për këtë arsye, suksesi në prodhimin e transgjenikëve për metabolitë të kategorisë së TPS mbetet një sfidë e rëndësishme e bioteknologjisë së bimëve.

### **Përfundime**

Numri i madh i TPS i dedikohet shumëllojshmërisë së enzimave përgjegjëse për sintezën e tyre (MTPS) dhe aftësisë së tyre për të krijuar produkte shumëfishe nga një substrat i vetëm.

Nuk ka raportime mbi modifikimet post-transkriptive të MTPS.

Monoterpen-sintetazat e izoluar nga koniferet kanë renditje aminoacidesh të ndryshme edhe në sitet aktive, krahasuar me ato të angiospermëve.

MTPs tek bredhi translatohen si pre-proteina, përmbajnë një aminoacid terminal “plastid targeting sequence 50-60 U”. Largimi i një fragmenti të shkurtër nga cADN-ja e tyre lejon shprehjen e formave “pseudomature” të enzimave.

Shprehja e MTPs tek mandarina është aktive në fazat e para të zhvillimit të frutit dhe gjatë periudhës së lulëzimit.

MTPs janë rregullatorë transkriptimi për gjenet koduese të seskuiterpeneve dhe diterpeneve. Tek *Abies Grandis*, si përgjigje ndaj dëmtimeve, MTP sintetizohen më herët nga kategoritë e tjera të TPS dhe shërbejnë si rregullatorë transkriptimi të tyre.

Disa specie bimore i ruajnë monoterpenet në struktura të specializuara (koniferet, *Lamiaceae*), të tjera nuk kanë struktura për ruajtje (*Quercus ilex* L.).

Raportimet mbi kapacitetin e një terpen-sintetaze të vetme për të prodhuar produkte shumëfishe shpesh lidhen me veçoritë e gjeneve të tyre koduese.

*Solanum lycopersicum* përmban 44 gjene përgjegjëse për terpen sintetazat (TPS), nga të cilët 29 janë funksionalë, dhe 26 shprehen në të paktën disa organe ose inde të bimës.

Monoterpenet, si produkte të metabolizmit sekondar, kanë për funksion mbrojtjen e bimës nga dëmtimet mekanike dhe insektet invazive, ndaj transkriptimi dhe translatimi i gjeneve përgjegjës për to rritet sidomos pas dëmtimeve mekanike.

Në disa specie, diversiteti i monoterpeneve është i lidhur me diversitetin funksional pas dublikimit të gjeneve.

*Salvia officinalis* ka karakteristikë ndikimin sezonal në shprehjen e gjeneve për MTP. Në nivel transkriptimi TPS shfaqin maksimum në mes të periudhës vegjetative.

Përpyqje të ndryshme janë bërë për të ndikuar në prodhim përmes inxhinierimit të MTPs, ndonëse hasen problem të lidhura me heshtjen e gjeneve përkatëse.

### Literatura

Anke Fähnrich, Katrin Krause, Birgit Piechulla. (2011): Product Variability of the 'Cineole Cassette' Monoterpene Synthases of Related *Nicotiana* Species. *Molecular Plant*. Vol. 4. No. 6; 965 – 984

Aubourg, S., Lecharny, A., Bohlmann, J. (2002): Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genomics* 267, 730–745

Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G. and R. Croteau. (1998): Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95, 4126-4133

Cane, D.E. (1999): *Comprehensive Natural Products Chemistry, Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*. vol. 2. Elsevier, Amsterdam; 155–200

Carsten Külheim, Amanda Padovan, Charles Hefer, Sandra T Krause, Tobias G Köllner, Alexander A Myburg, Jörg Degenhardt, Eilliam J Foley. (2014): The Eucalyptus terpene synthase gene family. *BMC Genomics*. DOI 10.1186/s12864-015-1598-x

Cheng, A., Lou, Y., Mao, Y., Lu, S., Wang, L. and X. Chen. (2007): Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*. 49, 179-186

Christopher L. Steele, Sadanobu Katoh, Jörg Bohlmann, Rodney Croteau. (1998): Regulation of Oleoresinosis in Grand Fir (*Abies grandis*). *Plant Physiology*. Vol. 116. No. 4; 1497 – 1504

Christianson, D.W. (2006): Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem. Rev.* 106, 3412–3442

Connolly, J.D., Hill, R.A. (1991). *Dictionary of Terpenoids*. Chapman and Hall, London

Connolly, J.D., Hill, R.A., (2005). Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 22, 487–503

Croteau, R. (1987): Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chemical Reviews*. 87, 929-954

David C. Eilliams, Douglas J. McGarvey, Eva J. Katahira, Rodney Croteau. (1998): Truncation of Limonene Synthase Preprotein Provides a Fully Active 'Pseudomature' Form of This Monoterpene Cyclase and Reveals the Function of the Amino-Terminal Arginine Pair. *Biochemistry*; 12213–12220. DOI: 10.1021/bi980854k



Davis, E.M., Croteau, R., (2000): Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids, Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes., vol. 209. Springer, Berlin Heidelberg; 53–95

Dewick, P.M. (1999): The biosynthesis of C-5-C-25 terpenoid compounds. Nat. Prod. Rep. 16, 97–130

Dudareva, N., Martin, D., Kish, C.M., Kolosova, N., Gorenstein, N., Fäldt, J., Miller, B., Bohlmann, J. (2003): (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. Plant Cell 15, 1227–1241

El Tamer, M.K., Smeets, M., Holthuysen, N., Lücker, J., Tang, A., Roozen, J., Bouwmeester, H.J. and A.G.J. Voragen. (2003): The influence of monoterpene synthase transformation on the odour of tobacco. Journal of Biotechn. 106, 15-21

Felipe Zapata, Paul V.A. Fine. (2013): Diversification of the monoterpene synthase gene family (TPSb) in *Protium*, a highly diverse genus of tropical trees. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 68, Issue 3; 432 – 442

Fraga, B.M., (2006). Natural sesquiterpenoids. Nat. Prod. Rep. 23, 943–972.

Hanson, J.R., (2000). Diterpenoids. Nat. Prod. Rep. 17, 165–174

Jörg Bohlmann, Michael Phillips, Vasanthi Ramachandiran, Sadanobu Katoh, Rodney Croteau. (1999): cDNA Cloning, Characterization, and Functional Expression of Four New Monoterpene Synthase Members of the Tpsd Gene Family from Grand Fir (*Abies grandis*). Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 368. Issue 2; 232 – 243

Lorenzo Del Terra, Valentina Lonzarich, Elisa Asquini, Luciano Navarini, Giorgio Graziosi, Furio Suggi Liverani, Alberto Pallavicini. (2013): Functional characterization of three *Coffea arabica* L. monoterpene synthases: Insights into the enzymatic machinery of coffee aroma. Phytochemistry. Vol. 89; 6 – 14

Lücker J, El Tamer MK, Scheab E, Verstappen FE, Van der Plas LH, Bouwmeester HJ, Verhoeven HA. (2002): Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*). cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. Eur J Biochem. 269(13):3160-71

Man Zhang, Jianyu Liu, Kai Li, Deyue Yu. (2013): Identification and Characterization of a Novel Monoterpene Synthase from Soybean Restricted to Neryl Diphosphate Precursor. PLoS ONE 8(10): e75972. doi:10.1371/journal.pone.0075972

Martin, D.M. and J. Bohlmann. (2004): Identification of *Vitis vinifera* (-)- $\alpha$ -terpineol synthase by in silico screening of full-length cDNA ESTs and functional characterization of recombinant terpene synthase. Phytochemistry. 65, 1223- 1229  
McGarvey, D.J. and R. Croteau. (1995): Terpenoid metabolism. The Plant Cell Online. 7, 1015-26

Mitchell L. Eise, Thomas J. Savage, Eva Katahira, and Rodney Croteau. (1998): Monoterpene synthases from Common Sage (*Salvia officinalis*) The Journal of Biological Chemistry. Vol 273. No. 24; 14891 – 14899

Sabine Grausgruber-Gröger, Corinna Schmiederer, Ralf Steinborn, Johannes Novak. (2012): Seasonal influence on gene expression of monoterpene synthases in *Salvia officinalis* (Lamiaceae). Journal of Plant Physiology. Vo.169, Issue 4; 353 – 359

Saeidnia S, Gohari AR, Haddadi A, Amin G, Nikan M, Hadjiakhoondi A. (2014): Presence of monoterpene synthase in four Labiatae species and Solid-Phase Microextraction- Gas chromatography-Mass Spectroscopy analysis of their aroma profiles. Pharmacognosy Res; 138–142. doi: 10.4103/0974-8490.129033

Saoealuck Bua-in, Yingyong Paisooksantivatana, Bart C. Eeimer, Srimek Choepongpang. (2014): Molecular Cloning and expression levels of the monoterpene synthase gene (ZMM1) in cassumunar ginger (*Zingiber Montanum* (Koenig) Link Ex Dietr.). Arch. Biol. Sci., Belgrade, 66(4). 1321 – 1331

Schwab, W., Williams, D.C., Davis, E.M. and R. Croteau. (2001): Mechanism of Monoterpene Cyclization: Stereochemical Aspects of the Transformation of Noncyclizable Substrate Analogs by Recombinant (–)-Limonene Synthase, (+)-Bornyl Diphosphate Synthase and (–)-Pinene Synthase. Archives of Biochemistry and Biophysics. 392, 123-136

Shelton DA, Zabarás, D, Chohan, S, Eyllie, SG, Baverstock, PR, Leach, DN & Henry, RJ. (2004): Isolation and partial characterization of a putative monoterpene synthase from *Melaleuca alternifolia*. Plant Physiology and Biochemistry. Vol. 42. No. 11; 875-882

Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., Hara, M. and M. Omura. (2005): Isolation and characterization of (E)-beta-ocimene and 1,8 cineole synthases in *Citrus unshiu* Marc. Plant Science. 168, 987-995

Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., Hara, M., Ueda, T., Kita, M. and M. Omura. (2004): Molecular cloning and functional characterization of four monoterpene synthase genes from *Citrus unshiu* Marc. Plant Science. 166, 49-58

Susan C. Trapp, Rodney B. Croteau. (2001): Genomic Organization of Plant Terpene Synthases and Molecular Evolutionary Implications. Genetics. Vol. 158. No; 811 – 832

Takehiko Shimada, Tomoko Endo, Hiroshi Fujii, Masakazu Hara, Takanori Ueda, Masayuki Kita, Mitsuo Omura. (2004): Molecular cloning and functional characterization of four monoterpene synthase genes from *Citrus unshiu* Marc. Plant Science. Volume 166. Issue 1; 49 – 58

Tholl, D. (2006a): Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. Current Opinion in Plant Biology. 9, 297-304

Tholl, D. (2006b): Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. Curr Opin Plant Biol. 9, 297-304

Thomas J. Savage, Milo E. Hatch, and Rodney Croteau. (1994): Monoterpene Synthases of *Pinus contorta* and Related Conifers. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 269. No. 6; 4012 – 4020

Trapp, S.C. and Croteau, R.B. (2001): Genomic Organization of Plant Terpene Synthases and Molecular Evolutionary Implications. *Genetics*. 158, 811-832

Vasiliki Falara, Tariq A. Akhtar, Thuong T.H. Nguyen, Eleni A. Spyropoulou, Petra M. Bleeker, Ines Schauvinhold, Yuki Matsuba, Megan E. Bonini, Anthony L.Schillmiller, Robert L. Last, Robert C. Schuurink, Eran Pichersky. (2011): The Tomato Terpene Synthase Gene Family. *Plant Physiology*. Vol. 157 no. 2; 770 – 789

Wise, M.L., Savage, T.J., Katahira, E. and R. Croteau (1998): Monoterpene Synthases from Common Sage (*Salvia officinalis*): cDNA isolation, characterization and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineol synthase and (+)-bornyl diphosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 273, 14891-14899

Wise, M.L., Croteau, R. (1999): *Comprehensive Natural Products Chemistry, Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*, vol. 2. Elsevier, Amsterdam; 97–135