

Signalna uloga L-arginina u bakterija

Madunić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:924803>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Madunić

Signalna uloga L-arginina u bakterija

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ana Madunić

A signalling role of L-arginine in bacteria

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen na Zavodu za Biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj u sklopu studijskog programa Molekularna biologija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Signalna uloga L-arginina u bakterija

Ana Madunić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Prijenos signala je ključan stanični proces koji omogućava usklađivanje i reguliranje metabolizma u svim domenama života. Funkcionira na način da se izvanstanična signalna molekula veže za membranski receptor te potiče njegovu konformacijsku promjenu s citosolne strane što dalje inducira pokretanje enzimske kaskade i omogućava svrshodan stanični odgovor. Proteinogena aminokiselina L-arginin pokazala se kao važan bakterijski signal, pogotovo u indukciji gena virulencije patogenih bakterija, u čemu joj pomaže protein ArgR. Specifično, L-arginin potiče prelazak bakterija roda *Pseudomonas* na životni stil u zajednici uronjenoj u jedinstveni izvanstanični matriks zvanog biofilm. U crijevnom patogenu enterohemoragičnoj *Escherichia coli*, L-arginin potiče ekspresiju gena virulencije i regulira ekspresiju domaćinskog prijenositelja L-arginina čime kontrolira apsorpciju ove aminokiseline u crijevima. To sugerira da L-arginin ima potencijalno važnu ulogu i u eukariotskoj borbi protiv patogenih bakterija, što je potvrđeno na mišjim peritonealnim makrofagima. Naime, povećana koncentracija egzogenog L-arginina znatno pojačava imunosti odgovor ovih makrofaga nakon njegove aktivacije lipopolisaharidima Gram-negativnih bakterija. Sve ovo navodi na zaključak da je L-arginin, uz kanonsku ulogu u izgradnji proteina, važan signal u molekularnom nadmetanju bakterijskih patogena i njihovih domaćina.

Ključne riječi: ArgR, biofilm, imunost, patogenost
(33 stranica, 14 slika, 2 tablice, 63 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

A signalling role of L-arginine in bacteria

Ana Madunić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Biosignalling is a crucial cellular process which enables the coordination and regulation of metabolism in all three domains of life. An extracellular signal binds to a membrane receptor and triggers a conformational change on its cytosolic side, which induces the activation of an enzymatic cascade and an appropriate cellular response. The proteinogenic amino acid L-arginine is an important bacterial signal, particularly in the induction of pathogenic bacteria virulence genes, with the protein ArgR's help. Specifically, L-arginine promotes the transition of *Pseudomonas* bacteria towards biofilm formation – a bacterial community that shares an extracellular matrix. In the intestinal pathogen enterohemorrhagic *Escherichia coli*, L-arginine serves as the activator of virulence gene expression and regulates the abundance of the enterocyte L-arginine transporter, thus controlling intestinal absorption of this amino acid. This suggests that L-arginine might play an important role in the eukaryotic defence against pathogenic bacteria, which has been confirmed in murine peritoneal macrophages. In particular, high concentrations of exogenous L-arginine significantly enhance the immune response of macrophages activated by lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. The conclusion is that L-arginine is an important factor in the molecular power struggle between bacterial pathogens and their hosts.

Keywords: ArgR, biofilm, immunity, pathogenicity
(33 pages, 14 figures, 2 tables, 63 references, original in: Croatian)
The thesis is deposited in the Central Biological Library.

Mentor: Prof. Ita Gruić Sovulj, Ph.D.

Popis kratica

ABC prenositelji: prenositelji s ATP-veznom kazetom, od engl. *ATP-binding cassette transporters*

Acetil-CoA: acetil-koenzim A

ADI put: arginin-deiminaza put katabolizma L-arginina

ADP: adenzin difosfat

AE lezije: lezije na enterocitama nastale prilikom infekcije, od engl. *attachment and effacement lesions*

AST put: arginin sukciniltransferazni put katabolizma L-arginina

ATP: adenzin trifosfat

Arg (R): L-arginin

ArgR: argininski represor i senzor

cAMP: ciklički adenzin monofosfat

c-di-GMP: ciklički digvanilat

DAG: diacilglicerol

DGC: digvanilat-ciklaza

ECM: izvanstanični matriks, od engl. *extracellular matrix*

EHEC: enterohemoragična *Escherichia coli*

ERK: tip kinaze regulirane izvanstaničnim signalom, od engl. *extracellular signal-regulated kinase*

Gb3: globotriaosilceramid

GPCR: tip receptora na koje se vežu G proteini, od engl. *G protein-coupled receptors*

HUS: hemolitički uremični sindrom

IFN- γ : interferon- γ

iNOS: inducibilna sintaza dušikovog oksida, od engl. *inducible nitric oxide synthase*

IP₃: inozitol-1,4,5-trisfosfat

JNK: c-JUN N-terminalna kinaza

LEE: otok patogenosti u *E. coli*, od engl. *locus of enterocyte effacement*

LPS: lipopolisaharidi Gram-negativnih bakterija

MAPK: mitogen-aktivirajuća proteinska kinaza

NADH: nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH: nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

OTC: L-ornitin-transkarbamoilaza

PBP: periplazmatski vezni proteini, od engl. *periplasmic binding proteins*

PDE: fosfodiesteraza, od engl. *phosphodiesterase*

PIP₂: fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat

PLC: fosfolipaza C, od engl. *phospholipase C*

ROS: reaktivni kisikovi spojevi, od engl. *reactive oxygen species*

SERCA: kanal Ca²⁺-ATP-aza sarkoplazmatskog/endoplazmatskog retikuluma, od engl. *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*

Stx2a: Shiga toksin 2

Sukcnil-CoA: sukcinil-koenzim A

VFT: domena Venerine muholovke, od engl. *Venus flytrap*

Sadržaj

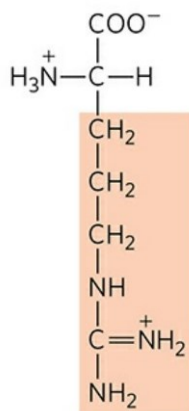
1. Uvod	1
2. Metabolizam i transport L-arginina.....	2
2.1. Biosinteza L-arginina <i>de novo</i>	2
2.2. Katabolički putevi L-arginina.....	4
2.3. Transport L-arginina.....	9
3. ArgR – transkripcijski regulator i senzor L-arginina	11
4. Uloga L-arginina u nastanku biofilmova u rodu <i>Pseudomonas</i>.....	15
5. L-Arginin kao faktor virulencije enterohemoragične <i>E. coli</i>.....	19
6. Pogled s druge strane ogledala: L-arginin kao signal u eukariotskoj borbi protiv patogena	23
7. Zaključak.....	25
8. Popis literature	27
9. Životopis.....	33

1. Uvod

Prijenos signala je ključan biološki koncept u svim domenama života. Stanice konstantno pretražuju okolni medij u potrazi za nutrijentima, kisikom, svjetlosti te kemikalijama koje sugeriraju prisutnost partnera, predatora i sl. Ti signali omogućavaju usklađivanje metaboličkih puteva prema potrebama i okolnostima u realnom vremenu. Signalne molekule se specifično i s velikim afinitetom vežu za pripadne membranske receptore nekovalentnim vezama s izvanstanične strane što u pravilu potiče konformacijske promjene na citosolnoj strani navedenog receptora. To dalje aktivira niz različitih proteina (kaskadu) koji sudjeluju u prijenosu informacije i amplifikaciji signala. Takve enzimske kaskade često završavaju indukcijom ili represijom transkripcije određenih gena. No, nije pravilno shvaćati kaskade kao linearne signalne puteve, već ih valja percipirati kao razgranate mreže signalnih puteva. Nakon nekog vremena neprekidne izloženosti receptora pojedinoj signalnoj molekuli, dolazi do desenzitizacije, odnosno receptor postaje neresponzivan na njezin podražaj. Važna karakteristika prijenosa signala je i činjenica da najčešće više različitih signala utječe na isti signalni put, stoga se podražaji integriraju u jedinstveni stanični odgovor. Receptori su sastavljeni od više proteina koji se mogu na različite načine sparivati i tako od relativno malog broja gena u stanici može nastati mnoštvo različitih multienzimskih receptorskih kompleksa koji imaju različitu supstratnu specifičnost i afinitet vezanja supstrata. Jasno je da bez prijenosa signala ne bi bilo života, stoga je u evoluciji i postanku prvih organizama kakvi danas postoje zasigurno bilo presudno uspostavljanje signalnih puteva koji će regulirati i omogućavati sve poznate stanične procese (Nelson i Cox, 2017).

Najraširenije i dobro istražene signalne molekule su, primjerice: ciklički adenzin monofosfat (cAMP), Ca^{2+} , ciklički digvanilat (c-di-GMP), hormoni itd. Jedan od slabije istraženih signalnih molekula kojemu se u posljednjih dvadesetak godina tek počeo otkrivati širok raspon signalnih uloga jest L-arginin (slika 1.). L-Arginin je jedna od dvadeset proteinogenih aminokiselina koja za bočni ogranak ima pozitivno nabijenu gvanidijsku grupu pa se grupira među bazične aminokiseline. L-arginin je aminokiselina s najviše dušikovih atoma što je čini potencijalnim izvorom dušika organizmima (Nelson i Cox, 2017). Ovaj rad bavit će se pregledom relativno nedavno otkrivenih signalnih uloga L-arginina u bakterijama te staničnim odgovorima koje uzrokuje, mahom vezanim uz patogenost. Osim toga, dotaknut će se i nekih signalnih uloga ove aminokiseline u eukariotima u slučajevima gdje L-arginin sudjeluje u borbi protiv bakterijskih

patogena. Time je cilj oslikati važnost L-arginina kao oružja u borbi za prevlast između patogena i domaćina.

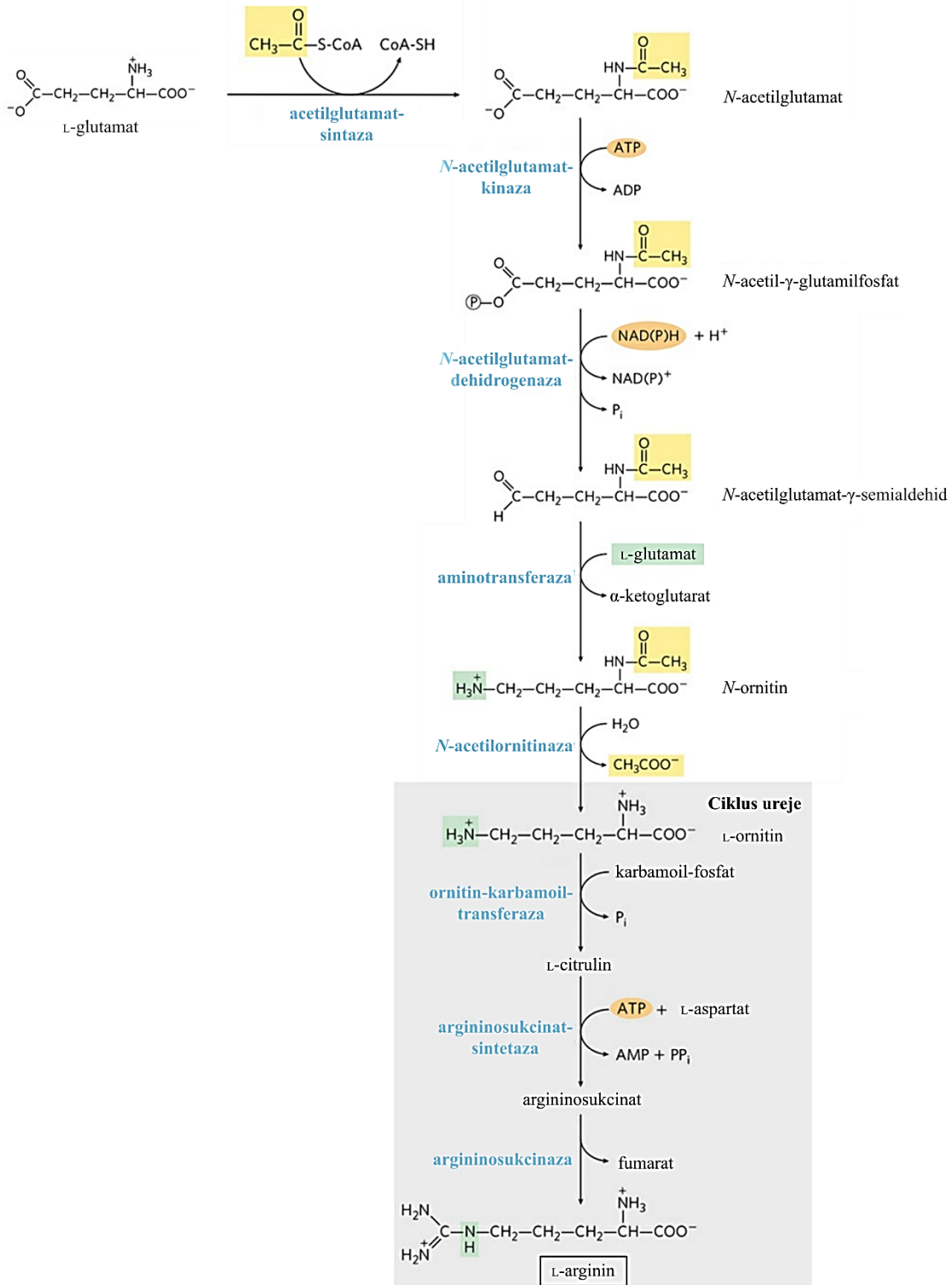


Slika 1. Kemijska formula L-arginina. Narančasto je obojan bočni ogranak gvanidij. Preuzeto i prilagođeno iz (Nelson i Cox, 2017).

2. Metabolizam i transport L-arginina

2.1. Biosinteza L-arginina *de novo*

Sinteza L-arginina u bakterijama odvija se od L-glutamata te napreduje do značajnog međuprodukta L-ornitina, a potom do ciljnog L-arginina (slika 2.). Najprije acetilglutamat-sintaza prenosi acetilnu skupinu iz acetilkoenzima A (acetyl-CoA) na α -amino skupinu glutamata što će služiti kao zaštita od cikliziranja u daljnjim koracima sinteze. Potom *N*-acetilglutamat-kinaza prenosi γ -fosfat ATP-a na γ -karboksilnu skupinu *N*-acetilglutamata. Na dobiveni produkt, *N*-acetil- γ -glutamilfosfat, djeluje enzim *N*-acetilglutamat-dehidrogenaza uz kofaktor NAD(P)H što, uz otpuštanje fosfata, daje produkt *N*-acetilglutamat- γ -semialdehid. Da glutamat nije prethodno *N*-acetiliran, u ovom bi koraku došlo do ciklizacije i nastanka prekursora L-prolina, umjesto L-arginina, stoga je vidljiv značaj prvog koraka sinteze. U sljedećem koraku aminotransferaza prenosi amino skupinu s glutamata na aldehidnu skupinu *N*-acetilglutamat- γ -semialdehida što daje produkte α -ketoglutarat i *N*-acetilornitin. *N*-acetilornitin se hidrolizom acetilne skupine pomoću *N*-acetilornitinaze pretvara u L-ornitin - neproteinogenu aminokiselinu ključnu u ciklusu ureje, s kojim proces biosinteze L-arginina dijeli preostale korake. Naime, L-ornitin-karbamoil-transferaza pomoću karbamoil-fosfata stvara L-citrulin - još jednu važnu neproteinogenu aminokiselinu. Dalje argininosukcinat-sintetaza pomoću aspartata i uz potrošnju ATP-a tvori argininosukcinat. U posljednjem koraku, argininosukcinaza stvara fumarat i L-arginin (Nelson i Cox, 2017).

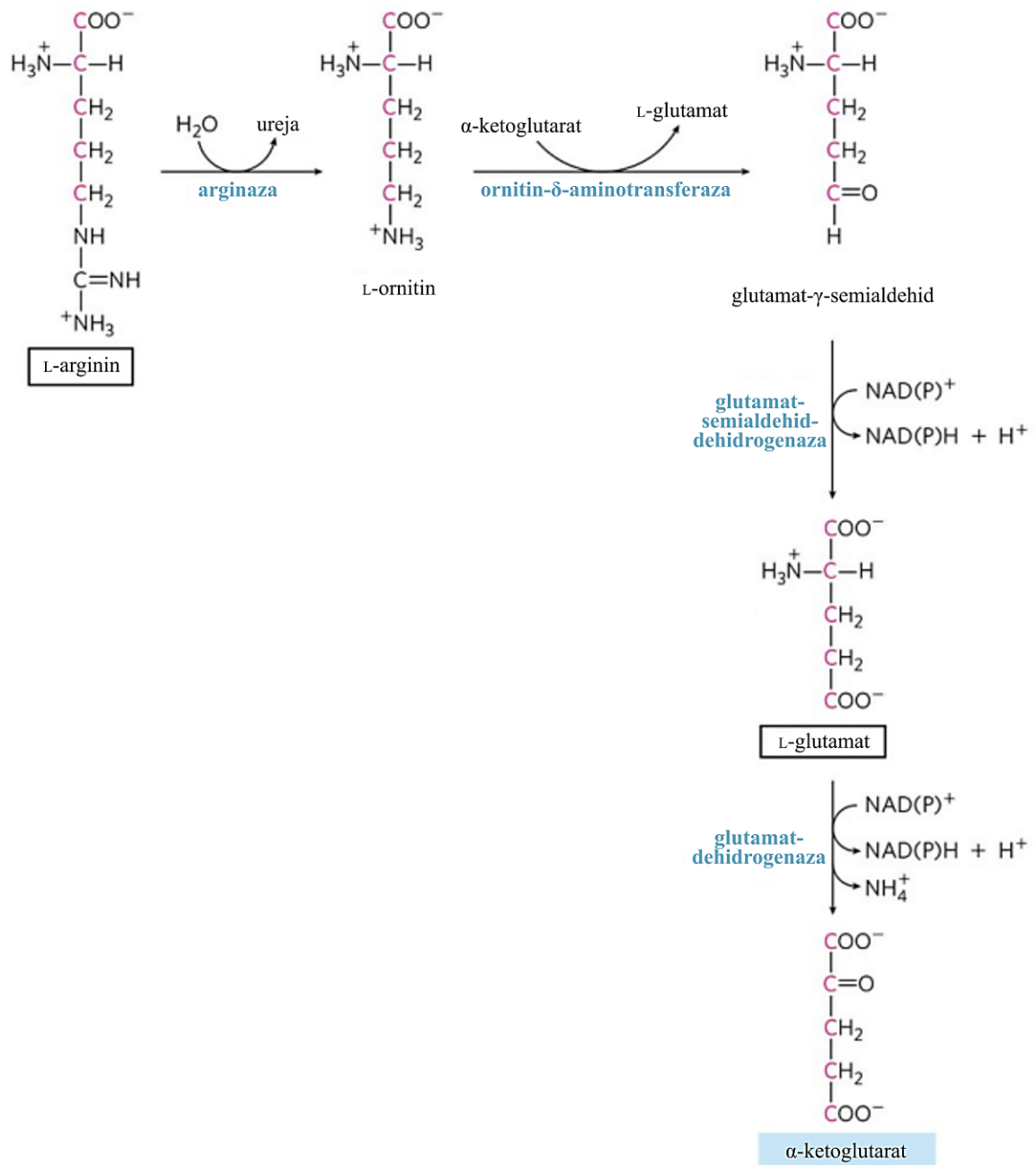


Slika 2. Pregled biosinteze L-arginina od L-glutamata. Istom bojom su naznačene određene skupine i spojevi od kojih dolaze. Preuzeto i prilagođeno iz (Nelson i Cox, 2017).

2.2. Katabolički putevi L-arginina

Postoji više mogućih puteva razgradnje L-arginina u bakterijama, čak njih četiri. Dakako, ne koriste sve bakterije sve te puteve razgradnje. Pokazalo se i da neki bakterijski rodovi mogu živjeti s L-argininom kao izvorom ugljika, dušika ili energije zahvaljujući ovoj razgranatoj kataboličkoj mreži (Hirose i sur., 2021; Moreno-Vivián i sur., 1992).

Prvi i najjednostavniji je put razgradnje koji se, takoreći, direktno nastavlja na sintezu L-arginina jer je jedan od koraka ciklusa ureje (slika 3.). Naime, enzim arginaza hidrolizira L-arginin do ureje i L-ornitina. Potom enzim ornitin- δ -aminotransferaza uz drugi supstrat α -ketoglutarat tvori glutamat i glutamat- γ -semialdehid, kojeg glutamat-semialdehid-dehidrogenaza uz kofaktor NAD(P)⁺ također prevodi u glutamat. Glutamat se pomoću glutamat-dehidrogenaze uz kofaktor NAD(P)⁺ prevodi u α -ketoglutarat. α -Ketoglutarat je intermedijer ciklusa limunske kiseline te se njegovom daljnjom oksidacijom može dobiti energija u obliku ATP-a (Nelson i Cox, 2017).

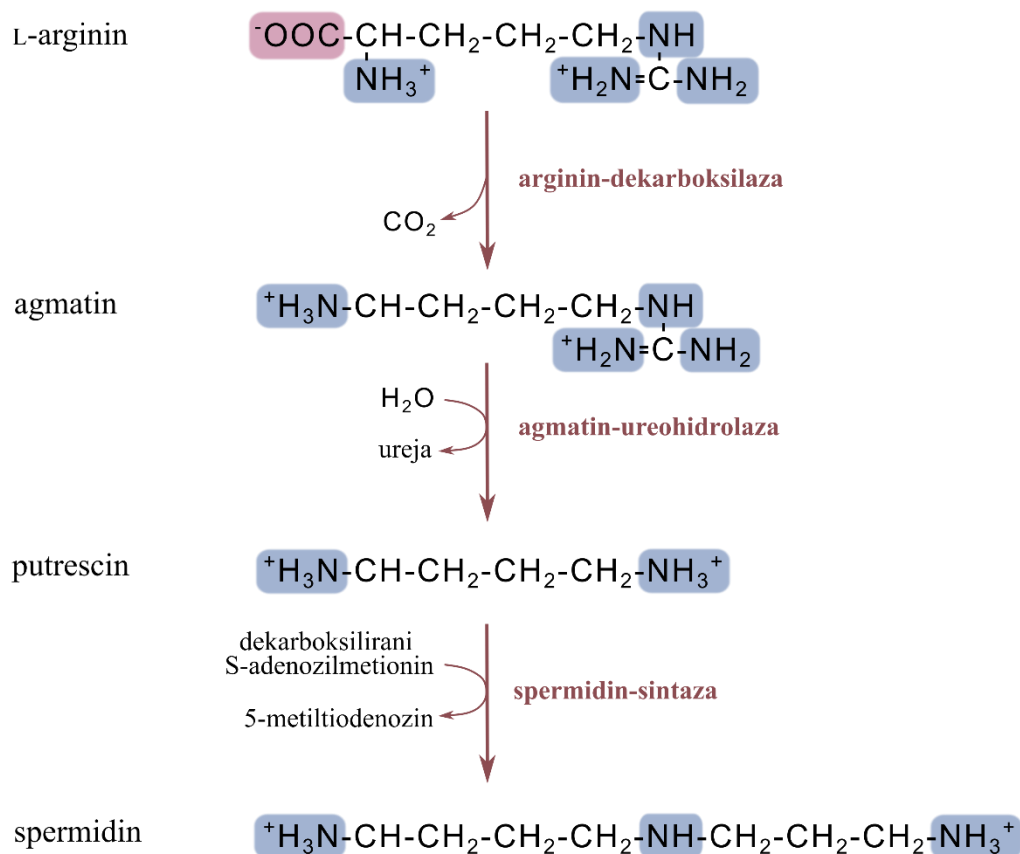


Slika 3. Pregled reakcija katabolizma L-arginina do α -ketoglutarata. Preuzeto i prilagođeno iz (Nelson & Cox, 2017).

Drugi put razgradnje L-arginina još se naziva i arginin-sukcinitransferazni put (AST put) (slika 4.). Geni koji kodiraju za enzime što sudjeluju u ovom metaboličkom putu sačinjavaju operon *astCABDE*. Prvi korak je prijenos sukcinilne skupine sa sukcinilkoenzima A (sukcinil-CoA) na L-arginin djelovanjem enzima arginin-sukcinitransferaze. Isto kako je rečeno da u biosintezi L-

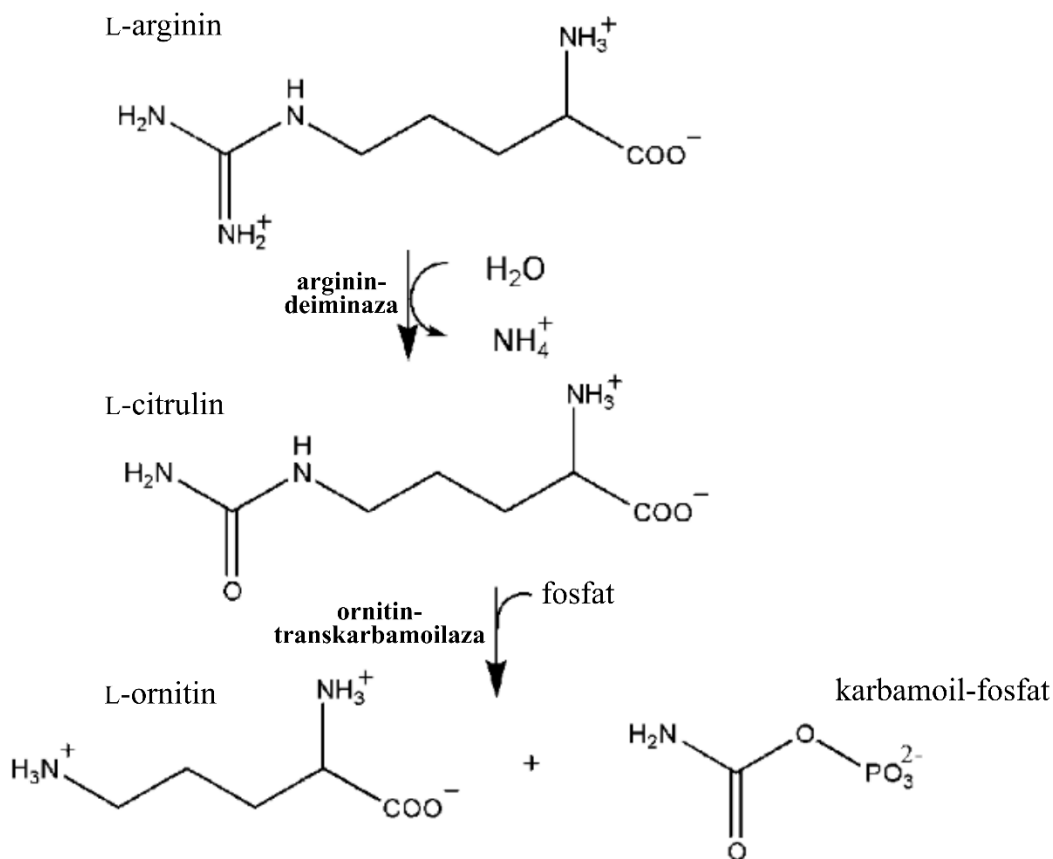
arginina acetilna skupina služi zaštiti *N*-acetilglutamat- γ -semialdehida od cikliziranja, u ovom slučaju sukcinilna skupina služi kao zaštita od cikliziranja u jednom od narednih međuprodukata. Sljedeći korak jest pretvorba *N*-sukcinilarginina i amonijaka u *N*-sukcinilornitin i CO₂ pomoću sukcinilarginin-dihidrolaze. Potom *N*-sukcinilornitin uz α -ketoglutarat katalizom sukcinilornitin-aminotransferaze daje *N*-sukcinilglutamat-semialdehid. Da α -amino skupina ovog međuproducta nije bila zaštićena sukcinilnom skupinom, došlo bi do nepoželjne ciklizacije. Idući korak je nastanak *N*-sukcinilglutamata djelovanjem enzima sukcinilglutamat-semialdehid-dehidrogenaze uz kofaktor NAD⁺. Zadnji korak ovog puta razgradnje jest nastanak L-glutamata i sukcinata djelovanjem enzima sukcinilglutamat-desukcinilaze (Charlier i Bervoets, 2019). Akumulacija L-glutamata je svojevrsna zaliha dušika jer je ova aminokiselina ključan donor amino skupine prilikom transaminacije na α -keto kiseline (slika 7.) (Nelson & Cox, 2017).

rast te postoje indicacije da su važni u SOS odgovoru i u stanju oksidacijskog stresa (Charlier i Glansdorff, 2004).



Slika 5. Pregled reakcija katabolizma L-arginina do poliamina. Amino skupina je naznačena plavom, a karboksilna skupina rozom bojom.

Preostali četvrti put razgradnje L-arginina jest put arginin-deiminaze (ADI put) (slika 6.). Prvi korak ovog puta jest pretvorba L-arginina u L-citrulin i amonijak pomoću enzima arginin-deiminaze. Potom slijedi pretvorba L-citrulina u karbamoil-fosfat i L-ornitin djelovanjem enzima ornitin-transkarbamoilaze (OTC, enzim ciklusa ureje). Karbamoil-fosfat i ADP se dalje prevode u amonijak i ATP (Cusumano i Caparon, 2015). ADI put je važan izvor ATP-a nekim bakterijama, primjerice *Streptococcus pyogenes*, koja u uvjetima slabe opskrbljenosti glukozom energiju dobiva upravo ovim putem. Uz to, pokazalo se da im to povećava virulenciju na površini kože, odnosno da je L-arginin nutrijent koji promovira patogenost u ovoj bakterijskoj vrsti (Hirose i sur., 2021).



Slika 6. Pregled reakcija katabolizma L-arginina do L-ornitina i karbamoil-fosfata. Preuzeto i prilagođeno iz (Galkin i sur., 2004).

2.3. Prijenos L-arginina

Prenositelji su membranski proteini prisutni u svim domenama života i ključni su u održavanju homeostaze. Postoje pasivni prenositelji koji ne troše energiju te aktivni koji troše, a dijele se na primarne (direktno koriste energiju ATP-a) i sekundarne prenositelje (koriste energiju koncentracijskog gradijenta nekog faktora kojeg pumpa drugi primarni prenositelj) (Nelson i Cox, 2017).

Kada su aminokiseline potrebne u stanici za sintezu proteina, aktiviraju se prenositelji koji ih unose u stanicu i pritom troše energiju ATP-a. Utrošak energije je manji kod unosa aminokiselina nego kod *de novo* biosinteze. Najčešći prenositelji aminokiselina su primarni ABC prenositelji (engl. *ATP-binding cassette transporters*), a tako vrijedi i za L-arginin kojeg mogu prenositi čak tri različita tipa ABC prenositelja u *E. coli*, kodirana u dva genska klastera: *artPIQM-artJ* i *argT-*

hisJQMP. Ovi ABC prenositelji nisu zaduženi isključivo za prijenos L-arginina već i za neke druge aminokiseline, kao što su L-lizin, L-ornitin, L-kanavanin te organske spojeve agmatin i putrescin. Spomenuta tri tipa ABC prenositelja razlikuju se u supstratnoj specifičnosti, afinitetu vezanja supstrata i regulaciji ekspresije gena koji ih sačinjavaju. Periplazmatski proteini ovih prenositeljskih kompleksa (ArtI, ArtJ, ArgT, HisJ) su ključni za supstratnu specifičnost i određuju afinitet vezanja supstrata. Prvi kompleks zvan ArtQMP₂ može se sklopiti s ArtJ ili ArtI periplazmatskim proteinima. Drugi kompleks zvan HisQMP₂ može se sklopiti s ArgT ili HisJ periplazmatskim proteinima. Smatra se da je ArtQMP₂ kompleks preferentan prenositelj L-arginina i L-ornitina u uvjetima eksponencijalnog rasta stanica, dok je HisQMP₂ kompleks preferentan za unos bazičnih i dušikom bogatih aminokiselina u uvjetima manjka dušika (Charlier i Bervoets, 2019).

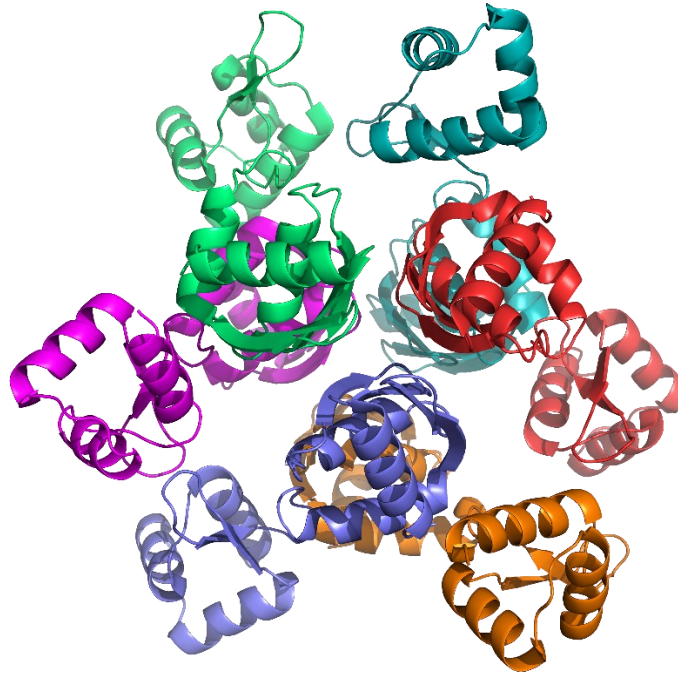
Osim ovih primarnih prenositelja, u *E. coli* postoje i sekundarni prenositelji L-arginina, kao što je arginin:agmatin antiporter zvan AdiC. AdiC jest vrlo važan u prilagodbi organizma na izrazito kisele uvjete kakve *E. coli*, primjerice, susreće prilikom prolaska kroz želudac sisavaca. Osim njega postoji i ArgO antiporter koji iznosi L-arginin i L-kanavanin iz stanice, a pritom unosi protone. Izgledno je da služi kao svojevrsni sigurnosni ventil za izbacivanje ovih dvaju spojeva ukoliko dosegnu toksične koncentracije u stanici (Charlier i Bervoets, 2019). Na slici 7. prikazani su svi prenositelji zaduženi za unos i izbacivanje L-arginina iz stanice, uz neke metaboličke puteve ove aminokiseline.

metabolizma i transporta arginina, isto čini i za još neke aminokiseline, kao što su histidin, lizin, fenilalanin, tirozin, triptofan, glutamat te aspartat (Cho i sur., 2011). Ta činjenica oslikava iznimnu važnost proteina ArgR, ali i njegovog kofaktora L-arginina u genskoj regulaciji metaboličkih i transportnih gena aminokiselina. Mogući razlog zašto baš L-arginin ima sveobuhvatnu regulacijsku ulogu jest činjenica da je aminokiselina s najvećim udjelom dušika zbog čega je pogodna signalna molekula za pružanje informacije o dostupnosti dušika u okolišu i svrsishodno prilagođavanje metabolizma. To dalje navodi da bi se protein ArgR mogao smatrati svojevrsnim senzorom L-arginina. Popis svih gena metabolizma i transporta aminokiselina reguliranih proteinom ArgR u *E. coli* prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Popis gena metabolizma i transporta aminokiselina unutar ArgR regulona u *E. coli*.
Prema (Cho i sur., 2011).

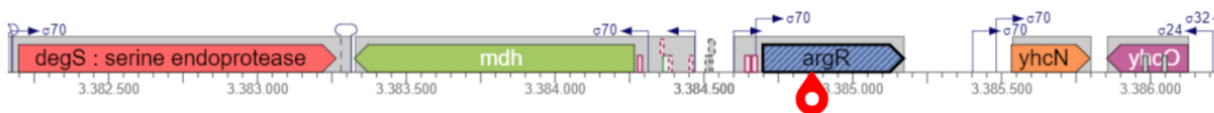
Uloga ArgR	Geni(i)	Opis genske funkcije
Represor	artMQIP, artJ	geni koji kodiraju prenositelje L-arginina
	hisJQMP	geni koji kodiraju prenositelje L-histidina
	carAB, argCBH, argA, argF, argG, argD, argE, argI	geni koji sudjeluju u biosintezi L-arginina
	hisLGDCBHAFI	geni koji sudjeluju u biosintezi L-histidina
	aroB, aroK	neki od gena koji sudjeluju u biosintezi aromatskih aminokiselina
	gltBD	neki od gena koji sudjeluju u biosintezi L-glutamata
	dapE	sukcinil-diaminopimelat-desukcinilaza, sudjeluje u biosintezi L-lizina
Aktivator	astCADBE	geni koji sudjeluju u katabolizmu L-arginina
	aroP	prijenosni protein aromatskih aminokiselina
	gltP	proton/glutamat-aspartat-simporter

Operator na koji se veže ArgR nalazi se uzvodno od gena unutar regulona te se sastoji od dvije susjedne palindromske regije od 18 parova baza (pb) nazvane ARG kutijama (Cunin i sur., 1983). Proces vezanja heksamera ArgR na dvije susjedne ARG kutije je kooperativan te uzrokuje savijanje molekule DNA. N- kraj proteina zadužen je za vezanje na ARG kutiju, a C-kraj proteina za oligomerizaciju i vezanje L-arginina (Maas, 1994). Reprezentativan primjer kojemu je eksperimentalno riješena kristalna struktura jest ArgR iz *Bacillus subtilis*, homoheksamer ukupne molekulske mase 101 kDa prikazan na slici 8. (Dennis i sur., 2002).



Slika 8. Kristalna struktura homoheksamernog proteina ArgR iz bakterije *Bacillus subtilis* (PDB ID: 1F9N). Podjedinice su nanačene različitim bojama. N-krajevi svake zasebne podjedinice su orijentirani na vani, a C-krajevi podjedinica su orijentirani prema unutrašnjosti proteina.

Gen *argR* smješten je uzvodno od gena koji kodira malat-dehidrogenazu (ključan metabolički enzim, sudjeluje u ciklusu limunske kiseline, glioksilatnom ciklusu i glukoneogenezi) i gena koji kodira serinsku endoproteazu DegS za koju je pokazano da ima ključnu ulogu u virulenciji sojeva *E. coli* koje izazivaju infekcije mokraćnog sustava, meningitis i sl. (Redford i ostali, 2003). Uzvodno od gena *argR* nalaze se gen koji kodira YhcN protein koji sudjeluje u odgovoru na stres izazvan vodikovim peroksidom i slabo istraženi protein YhcO za koji se smatra da bi mogao biti inhibitor barnaze (ribonukleaza *Bacillus amyloliquefaciens*) (slika 9.) (Hartley, 2001; Keseler i sur., 2021; Serres i sur., 2001). ArgR autoregulira maksimalno 70 % vlastite transkripcije. Razlog tome je što je *argR* gen pod kontrolom dvaju promotora od kojih jedan sadrži operatorsko mjesto s ARG kutijom gdje se odvija spomenuta autoregulacija ekspresije, dok je drugi slabi konstitutivni promotor (Lim i sur., 1987).



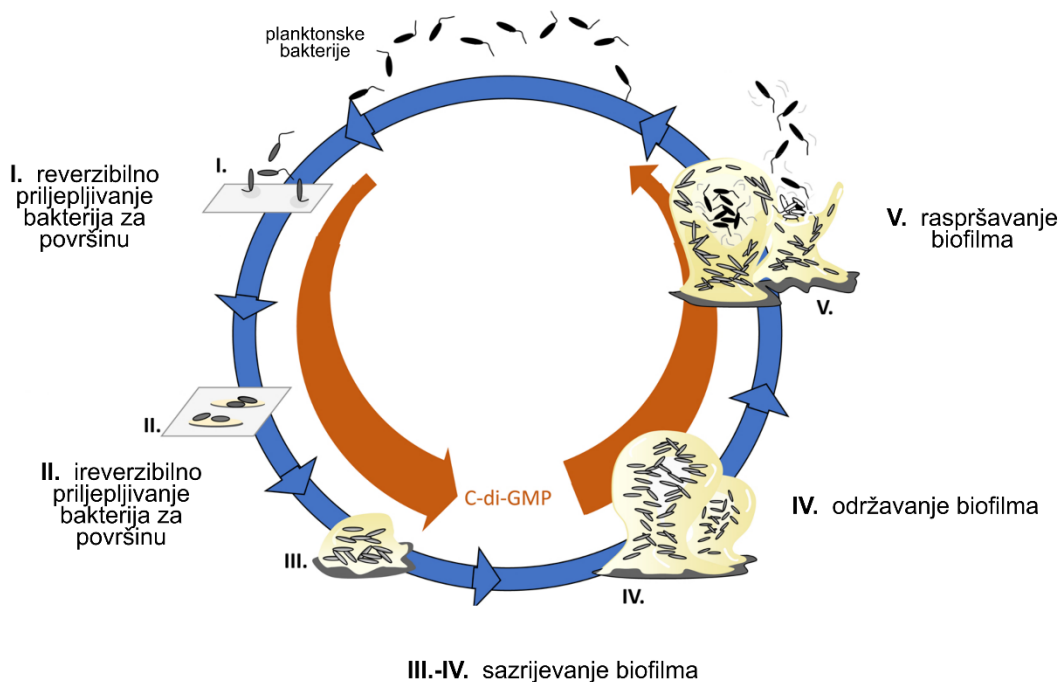
Slika 9. Genomski kontekst gena *argR*. Preuzeto iz EcoCyc Genome Browser (Keseler i sur., 2021).

Uočeno je da je ArgR u citosolu *E. coli* prisutan u prilično većim koncentracijama od one koja je potrebna za potpunu represiju svih ARG kutija u regulonu (Maas, 1994). To ukazuje da ovaj protein potencijalno ima još neke funkcije u stanicama. Pokazano je da ima ulogu u razrješavanju štetnih plazmidnih (ColE1) multimera tako što se veže na *cer* mjesta plazmidne DNA i osigurava pravilno razrješenje multimera. To omogućava pravilno nasljeđivanje plazmidnih monomera tijekom diobe. Uočeno je i da *cer* mjesta sadrže ARG kutiju (Stirling i sur., 1988a; Stirling i sur., 1988b). To djelomično objašnjava suvišak proteina ArgR. Osim tog pitanja, upitno je i zašto ArgR uopće vrši autoregulaciju, s obzirom da je 30 % ekspresije gena *argR* koja je konstitutivna dovoljno za potpunu represiju? U narednim poglavljima bit će govora o najnovijim otkrićima na temu uloga proteina ArgR koje bi mogle dati odgovore na ova pitanja.

4. Uloga L-arginina u nastanku biofilmova u rodu *Pseudomonas*

Biofilmovi su prevladavajući oblik života bakterija u prirodi, a podrazumijevaju mnogostanične zajednice bakterija priljubljene za površinu i uklopljene u zajednički izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*, *ECM*) (William Costeton i sur., 1995). To je svojevrsni evolucijski iskorak prokariota u smjeru mnogostaničnosti, koja je inače karakteristična za eukariote (iako postoje i jednostanični eukarioti). Biofilm omogućava bakterijskoj populaciji metaboličku suradnju, odnosno međusobnu izmjenu tvari i energije, te zaštitu od antimikrobnih tvari. Uz to, pogoduje horizontalnom prijenosu gena što povećava gensku raznolikost i ubrzava evoluciju populacije (Flemming i sur., 2016). Nastanak biofilma je aktivan proces koji troši energiju, stoga je vrlo strogo reguliran. Postoje tri razine regulacije nastanka biofilmova: regulacija okolišnim podražajima (npr. temperatura, pH vrijednost, dostupnost nutrijenata), regulacija sekundarnim glasnicima (najčešće pomoću cikličkog digvanilata, c-di-GMP-a) te regulacija međustaničnim glasnicima (Scribani Rossi i sur., 2022).

Ovaj rad će se nadalje pozabaviti regulacijom nastanka biofilmova u rodu Gram-negativnih bakterija *Pseudomonas* pomoću sekundarnog glasnika c-di-GMP-a. Pripadnica roda, *Pseudomonas aeruginosa*, oportunistički je patogen koji odlično raste u plućnom sputumu oboljelih od cistične fibroze (Palmer i sur., 2005), gdje tvori biofilmove rezistentne na antibiotike (Botto i sur., 1998). Generalno pravilo je da je pri povišenim koncentracijama c-di-GMP-a preferentan sjedilački oblik života bakterija, odnosno nastanak biofilmova, dok je pri sniženim koncentracijama c-di-GMP-a preferentan planktonski oblik života bakterija (slika 10.) (Scribani Rossi i sur., 2022). Unutarstanične razine c-di-GMP-a su regulirane enzimima sinteze i razgradnje ovog sekundarnog glasnika: digvanilat-ciklaze (DGC) koje sintetiziraju c-di-GMP od dvije molekule gvanozin trifosfata (GTP) (uz otpuštanje dvije molekule pirofosfata) te fosfodiesteraze (engl. *phosphodiesterase*, *PDE*) koje hidroliziraju c-di-GMP na dvije molekule gvanozin monofosfata (GMP). Proteini DGC imaju visoko očuvanu GGDEF domenu, dok PDE proteini imaju EAL ili HD-GYP domenu (Römling i sur., 2013; Tal i sur., 1998). Pokazano je da su nutrijenti, posebice aminokiseline, veoma značajni alosterički modulatori enzima DGC i PDE koji utječu na razine c-di-GMP-a (Rinaldo i sur., 2018). L-Arginin se istaknuo kao ključna signalna molekula u regulaciji razina c-di-GMP-a, o čemu će biti više riječi u narednim odlomcima. Periplazmatski proteini zaduženi za osjet nutrijenata (engl. *periplasmic binding proteins*, *PBP*) često sadrže tzv. domenu Venerine muholovke (engl. *Venus flytrap*, *VFT*). U pravilu, PBP prenose nutrijente na ABC prenositelje (engl. *ATP synthase-binding cassette transporters*) koji ih potom unose u stanicu (Cortes-Hernandez i Domínguez-Ramírez, 2017; Felder i sur., 1999).



Slika 10. Shema utjecaja c-di-GMP sekundarnog glasnika na životni stil bakterija. Preuzeto i prilagođeno iz (Park i Sauer, 2022).

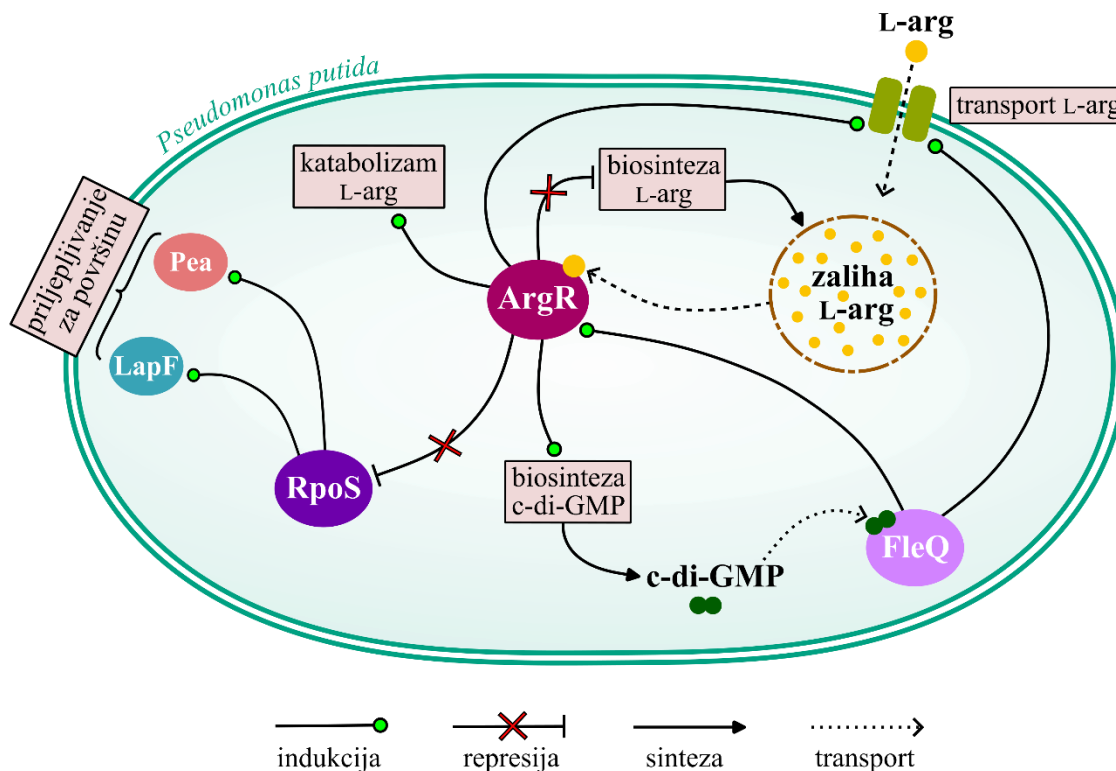
Bernier i suradnici (2011) pokazali su da je L-arginin jedina aminokiselina koja potiče nastanak biofilmova i istovremeno inhibira površinsku pokretljivost bakterija. Ostale aminokiseline su poticale oba bakterijska životna stila. Iz toga se može zaključiti da je vjerojatno L-arginin ključan u prijelazu iz planktonskog u sesilni životni stil, odnosno u nastanku biofilmova.

Više o ulozi L-arginina u nastanku biofilmova doznali su Paiardini i suradnici (2018). Naime, pronašli su multimerni protein PA0575 s domenom VFT, četiri Per-Arnt-Sim (PAS) domene i superdomenom GGDEF-EAL u *Pseudomonas aeruginosa*. *In silico* pretraživanjem baza podataka i sravnjenjem sekvenci pokazali su da je PA0575 iznimno visoke sličnosti arginin-veznom proteinu AncQR iz *E. coli* (99 %). Da bi *in vitro* ispitali veže li PA0575 L-arginin, pročistili su periplazmatski dio multimera PA0575 koji sadrži VFT domenu i izotermalnom titracijskom kalorimetrijom su dokazali da dolazi do vezanja L-arginina, ali ne i drugih aminokiselina. Što se tiče *in vivo* istraživanja, napravljen je soj s delecijom *Apa0575* te je uočeno da ukoliko raste suplementiran s L-argininom dolazi do povišenih koncentracija c-di-GMP-a u stanici, u odnosu na divlji tip. Konačno, kada su ovi izogeni sojevi rasli suplementirani drugim aminokiselinama nije bilo razlika u koncentraciji c-di-GMP-a između divljeg tipa i *Apa0575* mutante. Također, pokazali

su da je adhezija biofilmova na površinu za 12 % viša u mutanti *Δpa0575* nego li u divljem tipu pri suplementaciji L-argininom. Kod komplementacije delecije *Δpa0575* pomoću plazmida koji nosi gen za PA0575, adhezija biofilmova je porasla za 35 %. Ovakvi trendovi nisu uočeni kod suplementacije rasta bakterija drugim aminokiselinama. Rezultati impliciraju da je protein PA0575 igra ulogu fosfodiesteraze c-di-GMP-a uz pomoć kofaktora L-arginina kojeg veže VFT domenom što negativno regulira formaciju biofilmova u *P. aeruginosa*.

Nadalje, Barrientos-Moreno i suradnici (2022) su doznali kako je protein ArgR povezan s regulacijom sekundarnog glasnika c-di-GMP-a te nastankom biofilmova u bakteriji *Pseudomonas putida*. U rodu *Pseudomonas* ArgR protein djeluje kao aktivator ekspresije gena prijenosa i katabolizma te represor biosintetskih gena arginina (njegova aktivnost nije posve istovjetna kao ona u *E. coli*, koja je navedena u trećem poglavlju) (Lu i sur., 2004). Pokazali su da mutant *ΔargR* normalno raste u minimalnom mediju s glukozom kao izvorom ugljika i amonijakom kao izvorom dušika, ali slabo u minimalnom mediju s L-argininom ili L-lizinom kao izvorom ugljika i dušika. Iz toga se može zaključiti da je ArgR u *P. putida* nužan za transport i iskorištenje L-arginina i L-lizina. Nadalje, pokazali su i da je u divljem tipu s porastom koncentracije egzogenog L-arginina dodanog u medij rasla i koncentracija c-di-GMP-a, dok takav trend nije uočen u mutantu *ΔargR*, što sugerira da je ArgR nužan posrednik između L-arginina i c-di-GMP-a. Želeći istražiti utjecaj ArgR proteina na nastanak biofilmova, dobili su naizgled neobične rezultate. Naime, u mutanti *ΔargR* su uočili smanjenje površinske pokretljivosti bakterija koja je očekivana, ali i porast nastanka biofilmova, što je naizgled oprečno prethodnom pronalasku o vezi L-arginina i c-di-GMP-a. Međutim, otkrili su povišenu ekspresiju adhezina LapF i Pea, koji su važni za održavanje biofilmova prilijepljenima uz površinu (Martínez-Gil i sur., 2010; Nielsen i sur., 2011), u *ΔargR* mutanti. Otprije je poznato da ovim adhezинима alternativni sigma faktor RpoS kontrolira transkripciju (Liu i sur., 2019; Martínez-Gil i sur., 2010). Pokazali su da je ekspresija *rpoS* gena povećana u *ΔargR* mutanti, što znači da je ArgR represor transkripcije *rpoS* gena, koji pojačava ekspresiju gena adhezina *lapF* i *pea* koji su važni za priljepljivanje bakterija za površinu. Zadnja stavka istraživanja ove grupe jest otkriće o postojanju regulacije povratnom spregom između L-arginina i c-di-GMP-a. Otkrili su da je ekspresija *argR* gena regulirana pomoću c-di-GMP preko FleQ transkripcijskog regulatora na način da FleQ potiče ekspresiju *argT-hisQMP-argR* genskog klastera. Iz toga proizlazi da FleQ pomoću c-di-GMP potiče ekspresiju ArgR koji onda potiče sintezu c-di-GMP čime je krug zatvoren te se na taj način pojačava signal. Na slici 11. prikazana

je shema koja sumira istraživanja ove grupe. Ostaje neodgovoreno pitanje zašto ArgR istovremeno potiče nastanak biofilmova i pokretljivost bakterija te je potrebno još istraživanja da bi se razumljivo zamršeno klupko uloga ovog značajnog regulatora.



Slika 11. Shema utjecaja L-arginina i proteina ArgR na metabolizam i transport L-arginina i nastanak biofilmova. Legenda značenja strelica naznačena je na dnu slike.

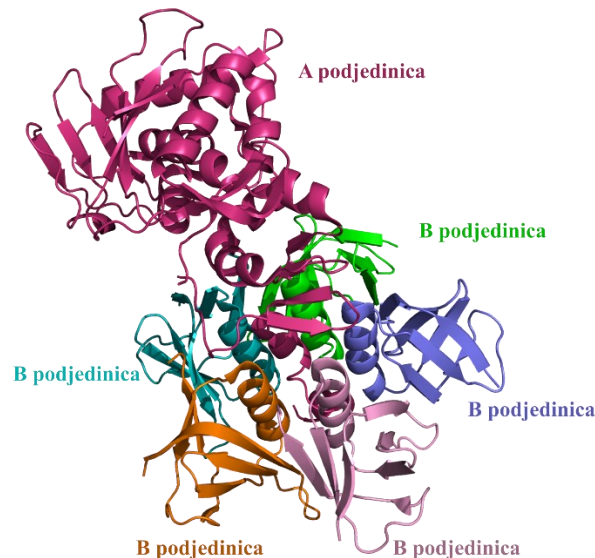
Naposljetku, iz svih ovih istraživanja može se zaključiti da je u rodu *Pseudomonas* L-arginin ključna signalna molekula koja potiče sesilni stil života bakterija, odnosno nastanak biofilma. To čini tako da pomoću proteina ArgR djeluje na enzime zadužene na sintezu ili hidrolizu sekundarnog glasnika c-di-GMP-a, koji je osnovna signalna molekula za formaciju biofilmova, te gene adhezina zaduženih za priljublivanje bakterija na površinu.

5. L-Arginin kao faktor virulencije enterohemoragične *E. coli*

Smatra se da mnogi sojevi Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* naseljavaju probavni trakt sisavaca već u prvim minutama po rođenju te se tamo zadržavaju tijekom cijeloga života jedinke. Takvi sojevi su komenzalski te obično ne izazivaju infekcije. Međutim, postoji malen, ali značajan

broj sojeva *E. coli* koji su razvili gene za virulenciju te parazitiraju u probavnom traktu sisavaca. Jedan od tih patotipova je enterohemoragična *E. coli* (EHEC) koja uzrokuje krvavi proljev, nekrvavi proljev i hemolitički uremični sindrom (HUS). Procijenjeno je da je potrebna iznimno niska infektivna doza da bi se razvila infekcija, manje od 100 bakterijskih stanica (Kaper i sur., 2004).

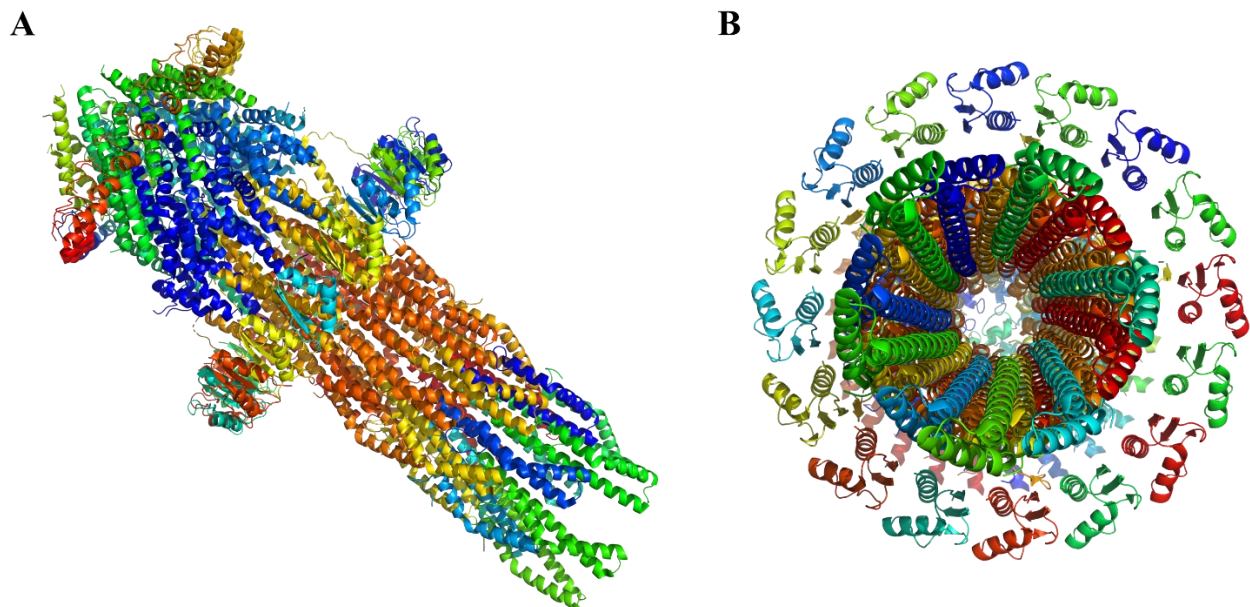
Osnovni faktor virulencije EHEC soja jest Shiga toksin 2 (Stx2a) koji djeluje tako da razgrađuje ribosomsku RNA (rRNA). Shiga toksini su viralnog porijekla, odnosno geni profaga λ (Wagner i sur., 2001). Stx2a je heksamer s podjedinicom A koja vrši cijepanje rRNA i pet podjedinica B koje služe za vezanje na glikolipid globotriaosilceramid (Gb3) (slika 12.) (Endo i sur., 1988; Jacewicz i sur., 1986; O'brien i Holmes, 1987).



Slika 12. Kristalna struktura Shiga toksina 2 iz bakterije EHEC (PDB ID: 4M1U). Podjedinice su naznačene na slici.

Osim toga, važni faktori virulencije su geni unutar otoka patogenosti LEE (engl. *locus of enterocyte effacement*) koji se sastoji od pet operona, nazvanih LEE1-5. Najvažniji LEE geni su gen za protein T3SS, efektorski geni koje T3SS unosi u kolonocite te transkripcijski regulator svih gena LEE nazvan Ler (engl. *LEE-encoded regulator*) (Kaper i sur., 2004; Mellies i sur., 1999). S obzirom na brojnost gena unutar LEE otoka patogenosti, jasno je da je potrebna stroga regulacija njegove ekspresije jer se njihovom transkripcijom i translacijom troši mnogo energije. Zato je

transkripcija Ler regulatora pod utjecajem brojnih domaćinskih i bakterijskih signalnih molekula kao što su epinefrin, norepinefrin, sukcinat i serin (Turner i sur., 2018). Na slici 13. prikazan je reprezentativni T3SS protein iz bakterije *Shigella flexneri* kojemu je eksperimentalno određena kristalna struktura. Vidljivo je da se radi o relativno velikom proteinu (slika 13., pod A) te da je u središtu šupljina kroz koju se efektorski proteini unose u enterocite (slika 13., pod B).



Slika 13. Kristalna struktura proteina T3SS iz bakterije *S. flexneri* (PDB ID: 8AXK). **A** pogled na cijeli protein izvana, **B** pogled kroz središte proteina.

Kod infekcija izazvanih EHEC sojem pojavljuju se karakteristične lezije enterocita, zvane AE lezije (engl. *attachment and effacement lesions*) koje podrazumijevaju razaranje crijevnih mikrovila i sljublivanje bakterija uz apikalnu membranu enterocita domaćina (Moon i sur., 1983). To uzrokuje nakupljanje aktinskih vlakana u apikalnom dijelu citoplazme enterocita koje vjerojatno služe pričvršćivanju bakterije uz enterocitu (Knutton i sur., 1989). Za nastanak AE lezija ključan je upravo T3SS protein kroz koji se unose efektorski proteini iz bakterije u enterocitu i posreduju infekciji (Jarvis i sur., 1995).

Citrobacter rodentium je bakterija koja sadrži LEE gene i formira AE lezije na mišjim kolonocitama pa se koristi kao mišji surogat za istraživanje EHEC soja zbog nemogućnosti

istraživanja humanih patogena *in vivo* (Mullineaux-Sanders i sur., 2019; Schauerlt i Falkow, 1993a; Schauerlt i Falkow, 1993b).

Menezes-Garcia i suradnici (2020) su istraživali virulenciju soja EHEC. Prvi nagovještaj da bi L-arginin mogao imati utjecaj na to bila je činjenica da su visokoprotocnim pretraživanjem metaboličkih puteva koji reguliraju ekspresiju gena virulencije EHEC soja pronađeni protein ArgR i prenositelj L-arginina ArtP kao potencijalni regulatori. Daljnjim istraživanjima je potvrđeno da ArgR i ArtP proteini doista sudjeluju u regulaciji ekspresije gena virulencije te je dokazano da L-arginin igra ključnu ulogu u tome, kao što se moglo očekivati. Drugim riječima, pokazali su *in vitro* da je pri rastu suplementiranom L-argininom u EHEC mutanti s delecijom $\Delta argR$ manja ekspresija *LEE* gena, sekrecija EspA i EspB te formacija AE lezija u odnosu na divlji tip i komplementacijski soj. U odsutstvu suplementacije L-argininom nije bilo razlike u ekspresiji navedenih gena mutante u odnosu na divlji tip i komplementacijski soj EHEC. Također, delecija $\Delta argR$ je uzrokovala smanjenu ekspresiju gena *stx2a*, odnosno Shiga toksina 2. To sugerira da je egzogeni L-arginin važna signalna molekula u ekspresiji gena patogenosti te da ArgR služi kao njegov senzor pa se zato u odsutstvu gena *argR* nije mogla potaknuti ekspresija spomenutih gena. Uz to, u mutanti $\Delta artP$ došlo je do smanjene ekspresije *LEE* gena, smanjene sekrecije EspA i EspB proteina te manjeg nastanka AE lezija, što potvrđuje ulogu egzogenog L-arginina u virulenciji ove bakterijske vrste. Zbog nemogućnosti istraživanja na humanim modelima, *in vivo* istraživanje je provedeno na širokoprihvaćenom mišjem surogatnom soju *C. rodentium*. U slučaju delecije $\Delta artP$ uopće nije došlo do naseljavanja bakterija u mišjim crijevima, što povlači pretpostavku da je ArtP ključan za naseljavanje. U slučaju delecije $\Delta argR$ došlo je do naseljavanja, ali u mnogo manjoj mjeri u odnosu na divlji tip. Uočeno je da je u crijevu inficiranih miševa povećana koncentracija L-arginina, što je u skladu s činjenicom da je na vrhuncu infekcije smanjena ekspresija domaćinskog prenositelja L-arginina SLC7A2 (Menezes-Garcia i sur., 2020).

Prethodno su Singh i suradnici (2016) oprečno pokazali da *C. rodentium* pojačava svoj patogeni učinak tako što povećava ekspresiju SLC7A2 proteina u domaćinskim enterocitama uz koje se priljubljuje, na kraju infekcije. Uz to, miševi s delecijom $\Delta slc7a2$ nisu bili podložni infekciji *C. rodentium*. Također se pokazalo da je protein Talin-1, koji je bitan za formaciju AE lezija, stabilniji u prisutstvu L-arginina. Suprotni rezultati ovih dviju grupa na temu ekspresije proteina SLC7A2 mogu se objasniti upotrebom mišjih sojeva različite podložnosti infekciji (Menezes-Garcia

i suradnici su 2020. radili sa infekciji podložnim sojem C3H/HeJ, a Singh i suradnici 2016. sa manje podložnim sojem C57BL/6) i analizom ekspresije u različitim stadijima infekcije. U svakom slučaju, izgledno je da dolazi do promjena ekspresije prenositelja L-arginina SLC7A2 u enterocitama inficiranih miševa, u odnosu na neinficirane. To povlači zaključak da je cilj patogena kontrolirati apsorpciju L-arginina u crijevima domaćina.

Dosadašnja istraživanja upućuju na to da egzogeni L-arginin uz pomoć senzora ArgR u crijevnim patogenima EHEC povećava ekspresiju gena virulencije *LEE* i *stx2a*, sekreciju efektorskih proteina EspA i EspB u enterocite, nastanak AE lezija te mijenja ekspresiju domaćinskih SLC7A2 prenositelja pri infekcijama izazvanima objema istraživanim bakterijama, enterohemoragičnoj *E. coli* i *C. rodentium*.

6. Pogled s druge strane ogledala: L-arginin kao signal u eukariotskoj borbi protiv patogena

Dosada je napravljen pregled nekih bakterijskih strategija patogenosti reguliranih L-argininom. Međutim, i neki eukariotski domaćini razvili su mehanizme imunosti koji su također pod utjecajem L-arginina o čemu će biti više riječi u nastavku poglavlja.

Makrofagi su imunostne stanice koje se smatraju prvom linijom obrane u borbi protiv upale ili infekcije. Jako su potentni fagociti, što dokazuje činjenica da jedan makrofag može fagocitirati do 100 bakterija i probaviti ih u lizosomima. Uz to, otpuštaju i reaktivne kisikove spojeve (ROS), kao što su superoksidi i peroksidi, te NO, hipoklorit i sl. koji djeluju baktericidno (Hall i Hall, 2021; Nathan, 1992). Enzim odgovoran za nastanak ROS-ova jest NADPH-oksidaza (Nelson i Cox, 2017), a inducibilna sintaza dušikovog oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase, iNOS*) je odgovorna za nastanak NO iz L-arginina (Lyons i sur., 1992). Makrofagi se aktiviraju signalnim molekulama kao što su: lipopolisaharidi Gram-negativnih bakterija (LPS), interferon- γ (IFN- γ), upalnim citokinima itd. (Lorsbach i sur., 1993; Mylonas i sur., 2009). Signalni putevi koji se potom induciraju su regulirani mitogen-aktivirajućim proteinskim kinazama (MAPK): kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase, ERK*) 1 i 2, c-JUN N-terminalna kinaza (JNK) i p38 MAPK koje onda nizvodno aktiviraju enzime što sudjeluju u imunosnom odgovoru (Guha i Mackman, 2001). Mnogi signalni putevi ovise o receptorima na koje se vežu G proteini (engl. *G protein-coupled receptors, GPCR*), koji dalje stimuliraju ili inhibiraju

nizvodne proteine signalnog puta. Neki od njih djeluju na fosfolipazu C (PLC), enzim koji od membranskog lipida fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata (PIP₂) proizvode diacilglicerol (DAG) i inozitol-1,4,5-trisfosfat (IP₃). IP₃ dalje služi kao glasnik koji potiče otvaranje kalcijevog kanala glatkog endoplazmatskog retikuluma (engl. *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*, *SERCA*) i ulazak Ca²⁺ u citosol što aktivira protein kinazu C koja djeluje na brojne proteine u stanici te ih aktivira ili inaktivira fosforilacijom (Nelson i Cox, 2017).

Pekarova i suradnici (2013) istraživali su efekt L-arginina na aktivaciju peritonealnih makrofaga miševa pomoću LPS Gram-negativnih bakterija te signalne puteve na koje L-arginin djeluje. *In vivo* dio istraživanja su provodili na četiri grupe miševa tretirane kako je prikazano u tablici 2.

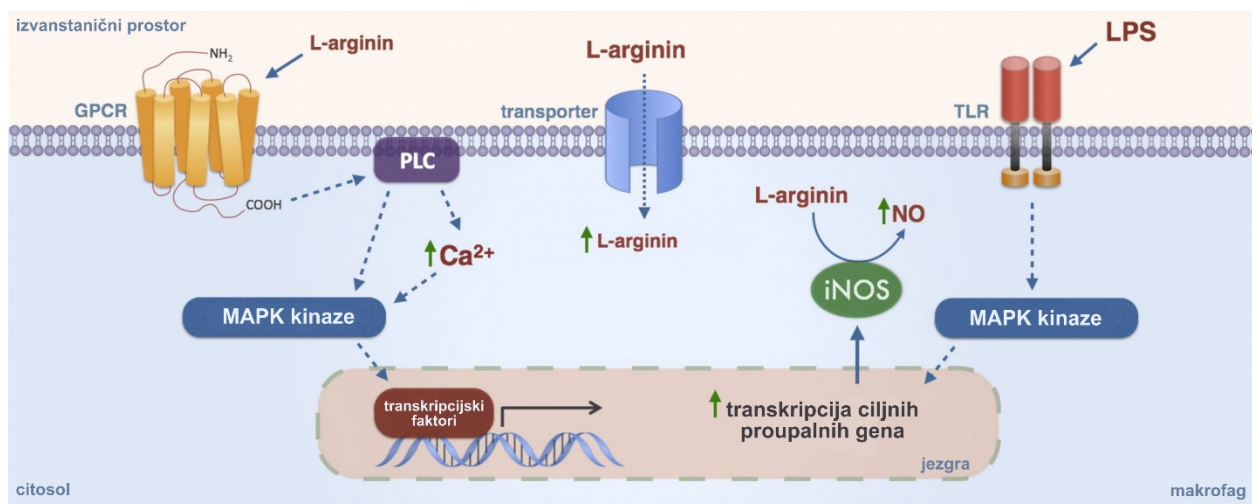
Tablica 2. Grupe miševa na kojima je provedeno u istraživanje i čime su tretirani tijekom perioda od sedam dana te što im je jednokratno injektirano na kraju zadnjeg dana istraživanja.

Grupa miševa	Sedmodnevan tretman	Jednokratno injektirano (nakon 7 dana)
A	Voda	PBS
B	Voda	PBS s LPS do doze 0,3 mg/kg
C	Voda s 30 mg/mL L-arginina	PBS
D	Voda s 30 mg/mL L-arginina	PBS s LPS do doze 0,3 mg/kg

Nakon jednokratnog injektiranja fosfatnog pufera sa ili bez LPS-a, uočili su pad koncentracije L-arginina i porast proizvodnje NO u plazmi kod grupa B i D u odnosu na kontrolu (grupe A, C). Pronašli su znatan porast fosforilacije ERK1/2 i p38 MAPK u grupi D, u odnosu na ostale grupe (A, B C), ali ne i povećanu ekspresiju ovih kinaza. Uz to, pokazali su da je koncentracija reaktivnih kisikovih spojeva bila dvostruko povećana u grupi D, u odnosu na grupu C. *In vitro* eksperimentima na izoliranim peritonealnim makrofagima su pokazali da L-arginin potencira fosforilaciju JNK1/2, ERK1/2 i p38 MAPK nakon stimulacije s LPS-ovima. Isto tako, uočili su da je povećana proizvodnja NO i ekspresija iNOS proteina u peritonealnim makrofagima uslijed stimulacije LPS-ovima i s povišenom koncentracijom L-arginina. Dalje su ustvrdili da se fosforilacija navedenih kinaza ne odvija u prisutstvu aminosteroida U73122 - inhibitora proteina

PLC (Bleasdale i sur., 1990), što znači da aktivacija ovih kinaza ovisi o GPCR-ovima (koji aktiviraju PLC). To su potvrdili utišavanjem nekih od njih, GPCR6a i CaSr, pomoću siRNA te se pokazalo da je smanjena fosforilacija JNK1/2 i ERK1/2, no ne i p38 MAPK.

Rezultati istraživanja ove grupe ukazuju na to da L-arginin ima ključnu ulogu u aktivaciji signalnih puteva koji potiču imunosni odgovor mišjih peritonealnih makrofaga uzrokovan lipopolisaharidima Gram-negativnih bakterija. Preciznije, makrofagi su stimulirani prisustvom spomenutih lipopolisaharida te L-arginin značajno ubrzava imunosni odgovor i povećava osjetljivost makrofaga na bakterijske endotoksine (slika 14.).



Slika 14. Shema utjecaja L-arginina na ubrzanje imunosnog odgovora peritonealnih makrofaga i signalnih puteva koji u tome posreduju. Preuzeto i prilagođeno iz (Pekarova i Lojek, 2015).

7. Zaključak

L-Arginin se pokazao kao važna stanična signalna molekula u bakterijskom svijetu, pogotovo u promociji patogenosti Gram-negativnih bakterija. Naime, L-arginin potiče sesilni stil života bakterija roda *Pseudomonas*, odnosno nastanak bakterije zajednice priljubljene za površinu zvane biofilm. Biofilmovi su iznimno rezistentni na antibiotike i poznato je da potpomažu infekciju pluća izazvanu bakterijom *P. aeruginosa*. Signalnu ulogu L-arginina omogućava argininski senzor i represor brojnih gena vezanih uz metabolizam i transport L-arginina, protein ArgR. ArgR s vezanim L-argininom dalje potiče enzime koji stvaraju/razgrađuju sekundarni glasnik ciklički digvanilat,

koji je osnovni element prelaska bakterijske zajednice iz planktonskog stila života na biofilm. Osim toga, ArgR s vezanim L-argininom inhibira sintezu adhezina koji služe priljepljivanju bakterija za površinu, što je oprečno prethodno spomenutoj ulozi. Ta opreka govori o tome koliko je ovaj sustav kompleksan i nedovoljno istražen te da mu je potrebno posvetiti još istraživačke pažnje. Nadalje, u humanom crijevnom patogenu enterohemoragičnoj *Escherichia coli* i njezinom mišjem surogatu, *Citrobacter rodentium*, utvrđeno je da L-arginin uz pomoć senzora ArgR povećava ekspresiju gena virulencije. Radi se o genima iz otoka patogenosti *LEE* i Shiga toksina 2, a uz to povećava i injekciju efektorskih proteina u crijevne enterocite i nastanak lezija te mijenja ekspresiju domaćinskog prenositelja L-arginina enterocita - *SLC7A2*, na dosada nerazjašnjen način. Naime, različite istraživačke skupine dobile su oprečne trendove ovisnosti ekspresije gena *slc7a2* o L-argininu. Unatoč tome, neosporno je da L-arginin ipak ima nekakav utjecaj na ekspresiju ovog prenositelja, odnosno da je strategija patogena kontrolirati apsorpciju prehrambenog L-arginina u crijevima. To sugerira da je važnost ove aminokiseline u molekularnom nadmetanju između prokariota i eukariota velika. To je potvrđeno činjenicom da L-arginin služi kao signalna molekula u imunosti nekih eukariota. To jest, u mišjim peritonealnim makrofagima se pokazao kao vrlo bitan pojačivač signala lipopolisaharida Gram-negativnih bakterija koji aktiviraju imunosni odgovor. Potrebno je nastaviti istraživanja na ovu temu da bi se bolje razumjeli fino regulirani molekularni mehanizmi kojima L-arginin sudjeluje u borbi za prevlast patogenih bakterija i njihovih domaćina, što bi potencijalno moglo dovesti do razvoja novih lijekova.

8. Popis literature

- Barrientos-Moreno, L., Molina-Henares, M. A., Ramos-González, M. I., & Espinosa-Urgel, M. (2022). Role of the Transcriptional Regulator ArgR in the Connection between Arginine Metabolism and c-di-GMP Signaling in *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, *88*(7). <https://doi.org/10.1128/aem.00064-22>
- Bernier, S. P., Ha, D. G., Khan, W., Merritt, J. H., & O'Toole, G. A. (2011). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling. *Research in Microbiology*, *162*(7), 680–688. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.014>
- Bleasdale, J. E., Thakur, N. R., Gremban, R. S., Bundy, G. L., Fitzpatrick, F. A., Smith, R. J., & Bunting, S. (1990). Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *255*(2), 756–768.
- Botto, M., Fong, K. Y., So, A. K., Koch, C., Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1998). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, *64*, 1229. www.sciencemag.org
- Charlier, D., & Bervoets, I. (2019). Regulation of arginine biosynthesis, catabolism and transport in *Escherichia coli*. *Amino Acids*, *51*(8), 1103–1127. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02757-8>
- Charlier, D., & Glansdorff, N. (2004). Biosynthesis of Arginine and Polyamines. *EcoSal Plus*, *1*(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.1.10>
- Cho, B. K., Federowicz, S., Park, Y. S., Zengler, K., & Palsson, B. (2011). Deciphering the transcriptional regulatory logic of amino acid metabolism. *Nature Chemical Biology*, *8*(1), 65–71. <https://doi.org/10.1038/nchembio.710>
- Cortes-Hernandez, P., & Domínguez-Ramírez, L. (2017). Role of cis-trans proline isomerization in the function of pathogenic enterobacterial Periplasmic Binding Proteins. *PLOS One*, *12*(11), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188935>
- Cunin, R., Eckhardt, T., Piette, J., Boyen, A., Pietard, A., & Glansdorff, N. (1983). Molecular basis for modulated regulation of gene expression in the arginine regulon of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, *11*(15). <https://academic.oup.com/nar/article/11/15/5007/1474362>
- Cunin, R., Kelker, N., Boyen, A., Yang, H. L., Zubay, G., Glansdorff, N., & Maas, W. K. (1976). Involvement of arginine in in vitro repression of transcription of arginine genes C, B and H in *Escherichia coli* K 12. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *69*(2), 377–382. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90532-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90532-5)

- Cusumano, Z. T., & Caparon, M. G. (2015). Citrulline Protects *Streptococcus pyogenes* from Acid Stress Using the Arginine Deiminase Pathway and the F_1F_o -ATPase. *Journal of Bacteriology*, *197*(7), 1288–1296. <https://doi.org/10.1128/JB.02517-14>
- Dennis C, C. A., Glykos, N. M., Parsons, M. R., & Phillips, S. E. V. (2002). The structure of AhrC, the arginine repressor/activator protein from *Bacillus subtilis*. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, *58*(3), 421–430. <https://doi.org/10.1107/s0907444901021692>
- Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., & Igarashi, K. (1988). Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes: RNA N-glycosidase activity of the toxins. *European Journal of Biochemistry*, *171*(1–2), 45–50. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13756.x>
- Felder, C. B., Graul, R. C., Lee, A. Y., Merkle, H. P., & Sadee, W. (1999). The venus flytrap of periplasmic binding proteins: An ancient protein module present in multiple drug receptors. *AAPS PharmSci*, *1*(2), 7–26. <https://doi.org/10.1208/ps010202>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Galkin, A., Kulakova, L., Sarikaya, E., Lim, K., Howard, A., & Herzberg, O. (2004). Structural Insight into Arginine Degradation by Arginine Deiminase, An Antibacterial and Parasite Drug Target. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(14), 14001–14008. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313410200>
- Guha, M., & Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling*, *13*, 85–94.
- Hall, J. E., & Hall, M. E. (2021). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (14. izd.). Elsevier.
- Hartley, R. W. (2001). Barnase–Barstar Interaction. *Methods in Enzymology*, *341*, 599–611. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)41179-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)41179-7)
- Hirose, Y., Yamaguchi, M., Sumitomo, T., Nakata, M., Hanada, T., Okuzaki, D., Motooka, D., Mori, Y., Kawasaki, H., Coady, A., Uchiyama, S., Hiraoka, M., Zurich, R. H., Amagai, M., Nizet, V., & Kawabata, S. (2021). *Streptococcus pyogenes* upregulates arginine catabolism to exert its pathogenesis on the skin surface. *Cell Reports*, *34*(13). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108924>
- Jacewicz, M., Clausen, H., Nudelman, E., Donohue-Rolfe, A., & Keusch, G. T. (1986). Pathogenesis of Shigella Diarrhea XI. Isolation of a Shigella Toxin-Binding Glycolipid from Rabbit Jejunum and HeLa Cells and Its Identification as Globotriaosylceramide. *Journal of Experimental Medicine*, *163*, 1391–1401.

- Jarvis, K. G., Giron, J. A., Jerse, A. E., Mcdaniel, Tim. K., Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (1995). Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation (bacterial pathogenesis/protein secretion/signal transduction). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *92*, 7996–8000. <https://www.pnas.org>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Keseler, I. M., Gama-Castro, S., Mackie, A., Billington, R., Bonavides-Martínez, C., Caspi, R., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P. E., Muñoz-Rascado, L., Ong, W. K., Paley, S., Santos-Zavaleta, A., Subhraveti, P., Tierrafría, V. H., Wolfe, A. J., Collado-Vides, J., Paulsen, I. T., & Karp, P. D. (2021). The EcoCyc Database in 2021. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.711077>
- Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P. H., & Mcneish, A. S. (1989). Actin Accumulation at Sites of Bacterial Adhesion to Tissue Culture Cells: Basis of a New Diagnostic Test for Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, *57*(4), 1290–1298. <https://journals.asm.org/journal/iai>
- Lim, D., Oppenheim, J. D., Eckhardt, T., & Maas, W. K. (1987). Nucleotide sequence of the *argR* gene of *Escherichia coli* K-12 and isolation of its product, the arginine repressor (repressor protein/regulatory gene/arginine regulon). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *84*, 6697–6701. <https://www.pnas.org>
- Liu, H., Yan, H., Xiao, Y., Nie, H., Huang, Q., & Chen, W. (2019). The exopolysaccharide gene cluster *pea* is transcriptionally controlled by RpoS and repressed by AmrZ in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbiological Research*, *218*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.09.004>
- Lorsbach, R. B., Murphy, W. J., Lowenstein, C. J., Snyder, S. H., & Russell, S. W. (1993). Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing: Molecular basis for the synergy between interferon- γ and lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(3), 1908–1913. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)53940-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53940-5)
- Lu, C. D., Yang, Z., & Li, W. (2004). Transcriptome analysis of the ArgR regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *186*(12), 3855–3861. <https://doi.org/10.1128/JB.186.12.3855-3861.2004>
- Lyons, C. R., Orloff, G. J., & Cunningham, J. M. (1992). Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(9), 6370–6374. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42704-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42704-4)
- Maas, W. K. (1994). The Arginine Repressor of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, *58*(4), 631–640. <https://journals.asm.org/journal/mr>

- Martínez-Gil, M., Yousef-Coronado, F., & Espinosa-Urgel, M. (2010). LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Molecular Microbiology*, 77(3), 549–561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07249.x>
- Mellies, J. L., Elliott, S. J., Sperandio, V., Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (1999). The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: Identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Molecular Microbiology*, 33(2), 296–306. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01473.x>
- Menezes-Garcia, Z., Kumar, A., Zhu, W., Winter, S. E., & Sperandio, V. (2020). L-Arginine sensing regulates virulence gene expression and disease progression in enteric pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 117(22), 12387–12393. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919683117>
- Moon, H. W., Whipp, S. C., Argenzio, R. A., Levine, M. M., & Giannella, R. A. (1983). Attaching and Effacing Activities of Rabbit and Human Enteropathogenic *Escherichia coli* in Pig and Rabbit Intestines. *Infection and Immunity*, 41(3), 1340–1351. <https://journals.asm.org/journal/iai>
- Moreno-Vivian, C., Soler, G., & Castillo, F. (1992). Arginine catabolism in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *European Journal of Biochemistry*, 204(2), 531–537. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16664.x>
- Mullineaux-Sanders, C., Sanchez-Garrido, J., Hopkins, E. G. D., Shenoy, A. R., Barry, R., & Frankel, G. (2019). *Citrobacter rodentium*–host–microbiota interactions: immunity, bioenergetics and metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 17(11), 701–715. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0252-z>
- Mylonas, K. J., Nair, M. G., Prieto-Lafuente, L., Paape, D., & Allen, J. E. (2009). Alternatively Activated Macrophages Elicited by Helminth Infection Can Be Reprogrammed to Enable Microbial Killing. *The Journal of Immunology*, 182(5), 3084–3094. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803463>
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB Journal*, 6, 3051–3064.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry* (7th izd.). W. H. Freeman and Company.
- Nielsen, L., Li, X., & Halverson, L. J. (2011). Cell–cell and cell–surface interactions mediated by cellulose and a novel exopolysaccharide contribute to *Pseudomonas putida* biofilm formation and fitness under water-limiting conditions. *Environmental Microbiology*, 13(5), 1342–1356. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02432.x>
- O’Brien, A. D., & Holmes, R. K. (1987). Shiga and Shiga-Like Toxins. *Microbiological Reviews*, 51(2), 206–220.

- Paiardini, A., Mantoni, F., Giardina, G., Paone, A., Janson, G., Leoni, L., Rampioni, G., Cutruzzolà, F., & Rinaldo, S. (2018). A novel bacterial L-arginine sensor controlling c-di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *86*(10), 1088–1096. <https://doi.org/10.1002/prot.25587>
- Palmer, K. L., Mashburn, L. M., Singh, P. K., & Whiteley, M. (2005). Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *Journal of Bacteriology*, *187*(15), 5267–5277. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5267-5277.2005>
- Park, S., & Sauer, K. (2022). *Controlling Biofilm Development Through Cyclic di-GMP Signaling* (str. 69–94). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-08491-1_3
- Park, S.-M., Lu, C.-D., & Abdelal, A. T. (1997). Purification and Characterization of an Arginine Regulatory Protein, ArgR, from *Pseudomonas aeruginosa* and Its Interactions with the Control Regions for the *car*, *argF*, and *aru* Operons. *Journal of Bacteriology*, *179*(17), 5309–5317. <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Pekarova, M., Kubala, L., Martiskova, H., Papezikova, I., Kralova, S., Baldus, S., Klinke, A., Kuchta, R., Kadlec, J., Kuchtova, Z., Kolarova, H., & Lojek, A. (2013). The unique role of dietary l-arginine in the acceleration of peritoneal macrophage sensitivity to bacterial endotoxin. *Immunologic Research*, *56*(1), 73–84. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8379-2>
- Pekarova, M., & Lojek, A. (2015). The crucial role of l-arginine in macrophage activation: What you need to know about it. *Life Sciences*, *137*, 44–48. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2015.07.012>
- Redford, P., Roesch, P. L., & Welch, R. A. (2003). DegS Is Necessary for Virulence and Is among Extraintestinal *Escherichia coli* Genes Induced in Murine Peritonitis. *Infection and Immunity*, *71*(6), 3088–3096. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3088-3096.2003>
- Rinaldo, S., Giardina, G., Mantoni, F., Paone, A., & Cutruzzolà, F. (2018). Beyond nitrogen metabolism: Nitric oxide, cyclic-di-GMP and bacterial biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, *365*(6). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny029>
- Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *77*(1), 1–52. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00043-12>
- Schauerlt, D. B., & Falkow, S. (1993a). Attaching and Effacing Locus of a *Citrobacter freundii* Biotype That Causes Transmissible Murine Colonic Hyperplasia. *Infection and Immunity*, *61*(6), 2486–2492. <https://journals.asm.org/journal/iai>
- Schauerlt, D. B., & Falkow, S. (1993b). The *eae* Gene of *Citrobacter freundii* Biotype 4280 Is Necessary for Colonization in Transmissible Murine Colonic Hyperplasia. *Infection and Immunity*, *61*(11), 4654–4661. <https://journals.asm.org/journal/iai>

- Schneider, B. L., Kiupakis, A. K., & Reitzer, L. J. (1998). Arginine Catabolism and the Arginine Succinyltransferase Pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *180*(16), 4278–4286. <https://doi.org/10.1128/JB.180.16.4278-4286.1998>
- Scribani Rossi, C., Barrientos-Moreno, L., Paone, A., Cutruzzolà, F., Paiardini, A., Espinosa-Urgel, M., & Rinaldo, S. (2022). Nutrient Sensing and Biofilm Modulation: The Example of L-arginine in *Pseudomonas*. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(8), 4386. <https://doi.org/10.3390/ijms23084386>
- Serres, M. H., Gopal, S., Nahum, L. A., Liang, P., Gaasterland, T., & Riley, M. (2001). A functional update of the *Escherichia coli* K-12 genome. *Genome Biology*, *2*(9). <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-9-research0035>
- Singh, K., Al-Greene, N. T., Verriere, T. G., Coburn, L. A., Asim, M., Barry, D. P., Allaman, M. M., Hardbower, D. M., Delgado, A. G., Piazuelo, M. B., Vallance, B. A., Gobert, A. P., & Wilson, K. T. (2016). The L-Arginine Transporter Solute Carrier Family 7 Member 2 Mediates the Immunopathogenesis of Attaching and Effacing Bacteria. *PLoS Pathogens*, *12*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005984>
- Stirling, C. J., Stewart, G., & Sherratt, D. J. (1988a). Multicopy plasmid stability in *Escherichia coli* requires host-encoded functions that lead to plasmid site-specific recombination. *Molecular and General Genetics MGG*, *214*, 80–84.
- Stirling, C. J., Szatmari, G., Stewart, G., Smith, M. C., & Sherratt, D. J. (1988b). The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the ColE1 *cer* locus. *The EMBO journal*, *7*(13), 4389–4395. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03338.x>
- Tal, R., Gelfand, D. H., Calhoon, R. D., Ben-Bassat, A., Benziman, M., & Wong, H. C. (1998). *Cyclic di-guanylate metabolic enzymes* (Patent 5759828).
- Turner, N. C. A., Connolly, J. P. R., & Roe, A. J. (2018). Control freaks—signals and cues governing the regulation of virulence in attaching and effacing pathogens. *Biochemical Society Transactions*, *47*(1), 229–238. <https://doi.org/10.1042/BST20180546>
- Wagner, P. L., Neely, M. N., Zhang, X., Acheson, D. W. K., Waldor, M. K., & Friedman, D. I. (2001). Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *Journal of Bacteriology*, *183*(6), 2081–2085. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.2081-2085.2001>
- William Costeton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Appin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, *49*, 711–745.

9. Životopis

Rođena sam 12. travnja 2002. godine u Splitu. 2017. godine završila sam Osnovnu školu Kman-Kocunar, a 2021. Treću gimnaziju Split te sam tijekom školovanja sudjelovala na državnim natjecanjima iz matematike i Natjecanju mladih Hrvatskog Crvenog križa. Izvanškolski sam se bavila umjetničkim plivanjem u KSP Dolfina te se također aktivno natjecala na državnim i međunarodnim natjecanjima. 2021. godine položila sam državnu maturu i upisala prijediplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Tijekom treće godine studija odrađivala sam laboratorijsku stručnu praksu na Zavodu za Biokemiju (mentorica: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj, komentor: dr. sc. Igor Živković). Rezultate svojeg istraživanja predstaviti ću poster-izlaganjem na konferenciji FEBS3+ Meeting: Exploring Molecular Frontiers u rujnu 2024.