

Agnieszka Włodarczyk¹ i Renata Matlakowska^{1*}

¹Pracownia Analizy Skażeń Środowiska, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Wpłynęło w sierpniu 2010 r.

1. Wprowadzenie. 2. Mechanizmy powstawania pęcherzyków błonowych. 3. Funkcje pęcherzyków błonowych. 3.1. Przenoszenie czynników wirulencji. 3.2. Przenoszenie czynników bakteriobójczych. 3.3. Inaktywacja antybiotyków. 3.4. Transfer DNA. 3.5. Degradacja związków wielkocząsteczkowych. 3.6. Interakcje z metalami. 3.7. Pęcherzyki błonowe jako składnik bakteryjnego biofilmu. 4. Podsumowanie

Membrane vesicles – secretion and transport system in Gram-negative bacteria

Abstract: A large number of Gram-negative bacteria produce outer membrane vesicles (OMVs). They are liberated from outer membrane and range in size from 50 to 250 nm. OMV contains lipopolysaccharides, outer membrane proteins and phospholipids as well as periplasmic proteins. They are utilized for several processes including delivery of toxins to eukaryotic cells, dissemination and protection of antimicrobial factors, protein and DNA transfer. Membrane vesicles play a role in interspecies as well as inter-kingdom communication. They play a role in trafficking of quorum signals and are a major component in biofilms. Moreover they can contain enzymes important in degradation of extracellular compounds.

1. Introduction. 2. Mechanisms of OMV formation. 3. Role of OMV. 3.1. Transfer of virulence factors. 3.2. Transfer of antimicrobials. 3.3. Antibiotics inactivation. 3.4. Transfer of DNA. 3.5. Degradation of extracellular organic compounds. 3.6. Interactions with metals. 3.7. Membrane vesicles in biofilm. 4. Conclusions

Słowa kluczowe: biofilm, pęcherzyki błonowe, quorum sensing, transfer DNA, transport białek

Key words: biofilm, DNA transfer, inter-kingdom communication, outer membrane vesicles, predatory OMVs, protein delivery, quorum sensing

1. Wprowadzenie

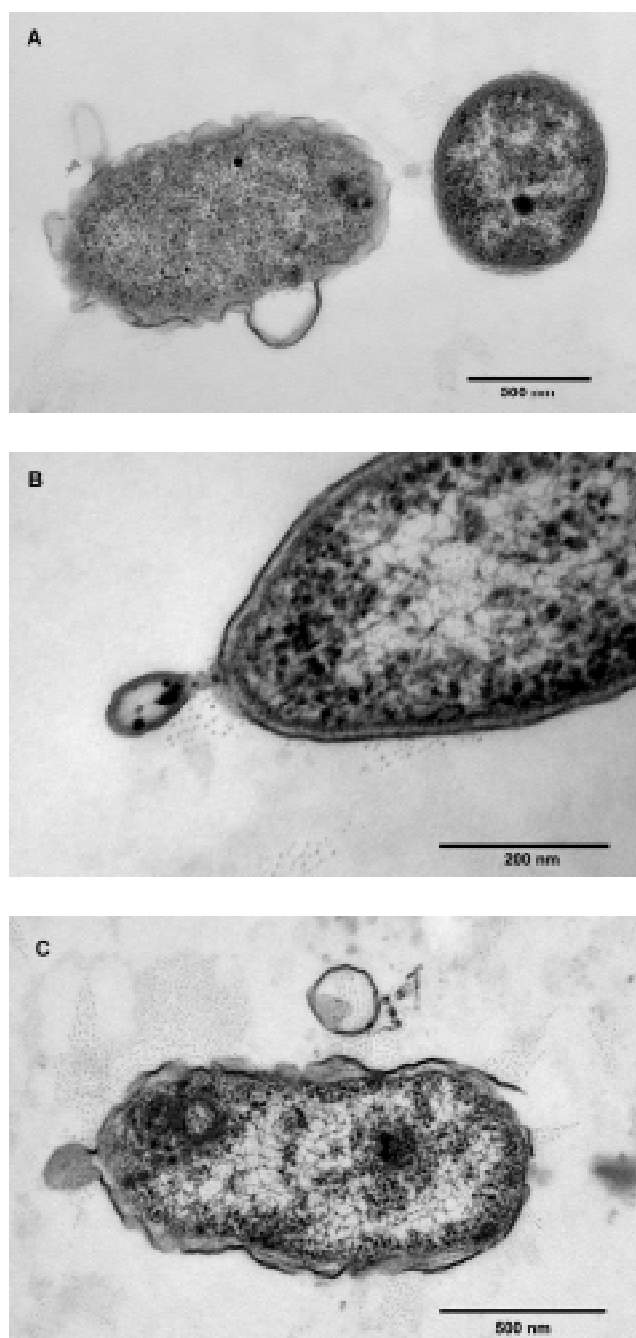
Pęcherzyki błonowe (OMV, outer membrane vesicle) są to zewnątrzkomórkowe struktury wytwarzane przez większość bakterii Gram-ujemnych. OMV powstają przez miejscowe uwypuklenie błony zewnętrznej bakterii, które prowadzi do oderwania się fragmentu błony w postaci sferycznie zamkniętej struktury o średnicy od 50 do 250 nm [4, 28, 51] (Rys. 1). Pęcherzyki błonowe otoczone są podwójną błoną fosfolipidową, która podobnie jak błona zewnętrzna, zbudowana jest z fosfolipidów, lipopolisacharydu (LPS) i białek [4, 33, 34]. Skład jakościowy i ilościowy białek obecnych w błonie pęcherzyka może się różnić od składu białkowego błony zewnętrznej. U *Xanthomonas campestris* w skład OMV wchodzi mniej niż połowa białek błony zewnętrznej, jednak wiele z nich występuje w pęcherzykach w znacznych ilościach. Różnice zaobserwowano również w budowie LPS błony zewnętrznej i OMV [68]. We wnętrzu pęcherzyków są obecne najczęściej składniki przestrzeni peryplazmatycznej, takie jak czynniki wirulencji, enzymy, czas-

teczone stanowiące sygnały zewnątrzkomórkowe, ale także składniki cytoplazmy, takie jak DNA.

Tworzenie pęcherzyków błonowych przez Gram-ujemne bakterie jest naturalnie występującym zjawiskiem, które obserwuje się u mikroorganizmów należących do różnych rodzajów, izolowanych z różnych środowisk, żyjących w konsorcjach, jak i samodzielnie, znajdujących się w różnych fazach wzrostu [5]. OMV są szczególnie intensywnie uwalniane przez bakterie patogenne [25, 39]. Przykładem jest enterotoksynogeny szczep *Escherichia coli*, który tworzy około dziesięciu razy więcej pęcherzyków błonowych niż niepatogeny szczep *E. coli* [72].

Pęcherzyki błonowe pierwszy raz zaobserwowano w 1966 roku analizując zdjęcia mikroskopowe komórek *E. coli* hodowanych w warunkach niedoboru lizyny [34, 76]. Dalsze badania udowodniły, że bardzo wiele Gram-ujemnych bakterii jest zdolnych do tworzenia OMV, w tym *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria* spp., *Shewanella* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides succinogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter*

* Autor korespondencyjny: Pracownia Analizy Skażeń Środowiska, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel./fax 22 5541219; e-mail: rmatlakowska@biol.uw.edu.pl



Rys. 1. Kolejne etapy tworzenia pęcherzyka błonowego u *Pseudomonas* sp. LM8. (A) Uwypuklona błona zewnętrzna komórki bakteryjnej. (B) Pęcherzyk błonowy odrywający się od powierzchni komórki. (C) Tworzący się oraz uwolniony z powierzchni komórki pęcherzyk błonowy.

pylori, *Brucella melitensis* i *Serratia marcescens*. Dotychczas większość prowadzonych badań skupiała się na drobnoustrojach chorobotwórczych uwalniających pęcherzyki błonowe zawierające czynniki wirulencji, natomiast niewiele jest informacji na temat bakterii środowiskowych i funkcji, jakie pełnią tworzone przez nie OMV.

Obecnie wiadomo, że nie tylko Gram-ujemne bakterie, ale także niektóre archeony wytwarzają pęche-

rzyki błonowe np. *Sulfolobus* spp. i *Ignicoccus* spp. [13, 55]. Dużym zaskoczeniem były wyniki badań naukowców z Korei Południowej, którzy w 2009 r. jako pierwsi zaobserwowali tworzenie OMV przez Gram-dodatnią bakterię – *Staphylococcus aureus* [40]. Następnie Tashiro i wsp. [70] wykazali, że pęcherzyki błonowe może również tworzyć *Bacillus subtilis*.

2. Mechanizm powstawania pęcherzyków błonowych

Mimo, że pierwszy raz tworzenie pęcherzyków błonowych przez Gram-ujemne bakterie zaobserwowano ponad 40 lat temu [34, 76], to dokładny mechanizm powstawania tych struktur pozostaje nieznan. Istnieje kilka teorii wyjaśniających to zjawisko. Trzy główne hipotezy sugerują, że formowanie się pęcherzyków błonowych jest spowodowane niestabilnością błony zewnętrznej, która w wyniku procesów fizycznych uwypukla się, a następnie oddziela od powierzchni komórki w postaci sferycznej struktury. Dopiero w ostatnich latach naukowcom udało się określić genetyczne podłoże powstawania pęcherzyków, z którym wiąże się możliwość regulacji tego procesu.

Jedną z pierwszych teorii dotyczącą powstawania OMV została opisana przez Wensik i Witholt [74]. Hipoteza ta zakłada, że pęcherzyki tworzą się wtedy, gdy synteza błony zewnętrznej bakterii zachodzi szybciej niż synteza leżącej pod nią warstwy peptydoglikanu. Rozrastająca się błona zewnętrzna fałduje się, a jej lokalny nadmiar zostaje oderwany w postaci pęcherzyka.

Inna hipoteza, zaproponowana przez Zhou i wsp. [79], głosi, że powstawanie pęcherzyków błonowych ma związek z obrotem metabolicznym mureiny. W przypadku bakterii Gram-dodatnich produkty metabolizmu ściany komórkowej są uwalniane do środowiska bez możliwości ponownego ich wykorzystania. U bakterii Gram-ujemnych muropetydy powstałe w czasie przebudowy ściany komórkowej są zatrzymywane w przestrzeni peryplazmatycznej i transportowane do cytoplazmy przez transbłonowe białka (permeazy) [22]. Zgromadzone w znacznych ilościach w peryplazmie fragmenty mureiny mogą mechanicznie oddziaływać na błonę zewnętrzną bakterii, prowadząc do jej wybrzuszenia i powstania pęcherzyka. Badania prowadzone przez Zhou i wsp. [79] potwierdzają, że pęcherzyki błonowe zawierają fragmenty mureiny oraz składniki błony zewnętrznej i przestrzeni peryplazmatycznej, natomiast nie występują w nich białka cytoplazmatyczne.

Kadurugamuwa i Beveridge [26, 27] sugerują, że tworzenie się OMV jest związane z anionową naturą błony zewnętrznej bakterii. Wyniki ich badań wykazały, że błona zewnętrzna bakterii *P. aeru-*

ginosa składa się z dwóch rodzajów lipopolisacharydu: jeden zawiera krótki łańcuch O-swoisty o słabym ładunku ujemnym (LPS-A), drugi natomiast zbudowany jest z długiego łańcucha O-swoistego naładowanego ujemnie (LPS-B). Pęcherzyki błonowe powstają przeważnie w miejscach bogatych w LPS-B, na co wskazuje duża zawartość w ich błonie tego lipopolisacharydu. Długie, ujemnie naładowane łańcuchy LPS-B odpychają się wzajemnie przyczyniając jednocześnie do znacznego uwypuklenia błony zewnętrznej mogącego przekształcić się w pęcherzyk.

Kolejny z proponowanych przez naukowców mechanizmów formowania się pęcherzyków błonowych związany jest z oddziaływaniem zewnątrzkomórkowego związku sygnałowego na błonę zewnętrzną bakterii. Mashburn-Warren i wsp. [49] udowodnili, że 2-heptylo-3-hydroksy-4-chinolon (PQS, *Pseudomonas* quinolone signal), związek będący sygnałem quorum sensing u *P. aeruginosa*, wykazuje silne powinowactwo do wewnętrznego fragmentu LPS – lipidu A i łącząc się z nim sprawia, że ujemnie naładowane łańcuchy lipopolisacharydu silniej się odpychają. Jednocześnie PQS wiąże się z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} występującymi pomiędzy łańcuchami LPS błony zewnętrznej powodując jej destabilizację, co może prowadzić do wyrzucenia błony i powstania pęcherzyka. Tashiro i wsp. [70] udowodnili, że PQS syntetyzowany przez *P. aeruginosa* może indukować powstawanie OMV u innych gramujemnych bakterii, takich jak *E. coli*, *Pseudomonas* spp. lub *Burkholderia* spp. Opisujący związek sygnałowy nie tylko wpływa na intensywność wytwarzania pęcherzyków, ale również na ich wielkość. Badania Tashiro i wsp. [70] wykazały, że dodanie do hodowli Gram-ujemnych bakterii związku PQS sprawia, że uwalniane przez mikroorganizmy pęcherzyki są większe. Ponadto naukowcy dowiedli, że PQS może indukować powstawanie pęcherzyków błonowych u Gram-dodatniej bakterii *B. subtilis*, która bez obecności tego związku pęcherzyków nie uwalnia. Nie wiadomo, w jaki sposób PQS mógłby wpływać na tworzenie OMV u bakterii pozbawionej błony zewnętrznej. Zjawisko to wymaga dalszych badań.

McBroom i wsp. [52], jako pierwsi starali się udowodnić, że tworzenie pęcherzyków błonowych przez bakterie ma swoje podłoże genetyczne. Zidentyfikowali oni kilkanaście genów *E. coli*, których dysrupcja powoduje u mutantów nadprodukcję OMV. Okazało się, że produkty wszystkich tych genów (m.in. białka TolA, TolB i Pal) pełnią ważne funkcje w budowie i funkcjonowaniu osłon bakteryjnych. Naukowcy wykryli również trzy geny: *degS*, *depP* i *rseA*, kodujące białka biorące udział w odpowiedzi komórki na stres, których inaktywacja również prowadzi do nadprodukcji pęcherzyków błonowych. McBroom i wsp. [52] wykazali, że mutanty *E. coli*

charakteryzujące się intensywnym wytwarzaniem OMV nie syntetyzują większej ilości składników błony zewnętrznej, od szczepu dzikiego ale za to rosną wolniej od niego. Brak u mutantów niektórych białek błonowych powoduje defekty w budowie osłon bakteryjnych oraz zwiększa wrażliwość komórek na detergenty, ale nie oddziałuje negatywnie na tworzenie pęcherzyków [52].

Najnowsze wyniki badań prowadzonych przez Deatherage i wsp. [10] rzucają nowe światło na sposób powstawania pęcherzyków błonowych. Proponowany przez naukowców mechanizm tworzenia OMV opiera się na zmianie składu białkowego błony zewnętrznej bakterii w miejscu powstawania pęcherzyka. Błona zewnętrzna połączona jest z leżącą poniżej warstwą mureiny i błoną wewnętrzną za pomocą specyficznych białek, takich jak LppAB, OmpA, TolB, TolA oraz Pal. Ilość tych białek w błonie zewnętrznej wpływa na stopień integracji błony z pozostałymi osłonami komórkowymi. Deatherage i wsp. [10] udowodnili, że w miejscu formowania się pęcherzyka u *Salmonella* sp. zmniejsza się liczba obecnych w błonie zewnętrznej białek, dzięki czemu błona może oddzielić się od niżej leżących warstw i utworzyć pęcherzyk. Dodatkowo Deatherage i wsp. [10] zidentyfikowali główne białka obecne w pęcherzykach (OmpC, OmpF, NmpC, OmpX, OmpA, LppAB, Pal, TolB, TolA) i określili ich znaczenie w formowaniu się tych struktur. Mutanty *Salmonella* sp. pozbawione białek OmpC, OmpF, NmpC, OmpX nie różniły się od szczepu dzikiego, podczas gdy mutanty nie syntetyzujące białek OmpA, LppAB, Pal, TolB lub TolA charakteryzowały się wzmożonym wytwarzaniem OMV. Naukowcy udowodnili również, że brak w błonie zewnętrznej niektórych białek wpływa na wielkość tworzących się pęcherzyków. Hodowany przez nich mutant *lppAB* wytwarzał mniejsze pęcherzyki niż szczep dziki, natomiast pęcherzyki uwalniane przez mutanty *pal*, *tolB* i *tolA* były znacznie większe od pęcherzyków szczepu dzikiego. Deatherage i wsp. [10] sugerują, że *Salmonella* sp. reguluje proces tworzenia pęcherzyków błonowych zmieniając skład jakościowy i ilościowy białek błony zewnętrznej w miejscu, w którym ma powstać pęcherzyk. Jest to odpowiedź na zmieniające się warunki środowiska, takie jak pH, temperatura czy siła jonowa. Teorię potwierdzają wcześniejsze doświadczenia, które pokazały, że komórki *Salmonella* sp. rosnące w makrofagach charakteryzują się obniżonym poziomem transkryptu białek Lpp i OmpA [16]. Warto zwrócić uwagę na fakt, że część z wymienionych białek jest kodowana przez geny, które zostały inaktywowane w badaniach McBroom i wsp. [52], i których brak ekspresji przyczyniał się do nadprodukcji pęcherzyków błonowych. Przypuszcza się, że na powstawanie OMV

oprócz białek błony zewnętrznej mogą mieć wpływ inne czynniki, takie jak modyfikacje lipopolisacharydu oraz wielkość i kształt komórki [10].

Mikroorganizmy wytwarzają pęcherzyki błonowe w określonych warunkach, przystosowując się do zmieniającego się środowiska, dlatego od dawna przypuszczano, że istnieje sposób regulacji tego procesu. Jednak większość powstałych na ten temat teorii przedstawiała tworzenie OMV, jako zjawisko związane z niestabilnością błony zewnętrznej bakterii, niepodlegające kontroli na poziomie genetycznym. Dopiero Dea t h e r a g e i wsp. [10] wyjaśniają, w jaki sposób bakterie mogą kontrolować proces powstawania pęcherzyków błonowych. Wyniki ich badań dotyczące mechanizmu tworzenia OMV przez szczep *Salmonella* sp. mogą tłumaczyć powstawanie tych struktur u innych grup mikroorganizmów. Szczegółowe analizy ujawniły, że trzydzieści jeden rodzin Gram-ujemnych bakterii koduje przynajmniej jedno z przebadanych przez Dea t h e r a g e i wsp. [10] białek błony zewnętrznej: Lpp, OmpA, Pal, TolB lub TolA. Białka te nie zawsze charakteryzują się wysoką homologią między poszczególnymi rodzinami, ale wszystkie posiadają konserwowane domeny odpowiedzialne za łączenie się tych białek z peptydoglikanem lub z innymi białkami. Można przypuszczać, że opisany przez Dea t h e r a g e i wsp. [10] mechanizm tworzenia pęcherzyków błonowych jest uniwersalny dla wszystkich Gram-ujemnych bakterii.

3. Funkcje pęcherzyków błonowych

Pęcherzyki błonowe stanowią swego rodzaju system sekrecji i transportu [54]. Mikroorganizmy otaczając podwójną błoną wydzielane do środowiska substancje, chronią je przed szkodliwym działaniem czynników zewnętrznych i zapewniają im bezpieczny transport. Niewielkie rozmiary pęcherzyków pozwalają na dostarczenie przenoszonych przez nie związków w miejsca niedostępne dla komórek bakteryjnych [37].

Prowadzone do tej pory badania wykazały, że tworzenie pęcherzyków błonowych może być reakcją komórki bakteryjnej na działanie czynników stresowych, takich jak obecność antybiotyków, czy niedobór składników odżywczych [53].

Pęcherzyki błonowe, w zależności od tego, jakie związki przenoszą, pełnią różne funkcje. Dostarczając do komórek eukariotycznych czynniki wirulencji biorą udział w procesie patogenez. Zawarte w nich autolizyny degradują ścianę komórkową innych bakterii zapewniając wytwarzającym je mikroorganizmom przewagę w walce o zasoby środowiska. Pęcherzyki chronią komórki drobnoustrojów przed działaniem antybiotyków, uczestniczą w przekazywaniu sygnałów

zewnątrzkomórkowych, biorą udział w transferze DNA oraz redukcji metali, a także ułatwiają bakteriom rozkład trudnodegradowalnych związków wielkocząsteczkowych. Pęcherzyki błonowe pośredniczą w oddziaływaniu bakterii z innymi komórkami tego samego gatunku, innych rodzajów oraz z organizmami eukariotycznymi. Są to główne procesy, w których uczestniczą pęcherzyki błonowe, jednak podstawowa rola tych struktur ogranicza się do ochrony i transportu zawartych w nich substancji. Uwalnianie pęcherzyków błonowych przez bakterie ma na celu efektywną kolonizację danego środowiska, dlatego mikroorganizmy wytwarzają OMV w znacznych ilościach, mimo, że stanowi to dla nich duży wydatek energetyczny.

3.1. Przenoszenie czynników wirulencji

OMV są wykorzystywane przez wiele patogennych bakterii jako przenośniki czynników wirulencji do komórek eukariotycznych [26, 37, 54]. Badania potwierdzają, że pęcherzyki wytwarzane przez *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *E. coli*, *Actinobacillus actinomycetecomitans*, *Borrelia burgdorferi*, *Bacteroides fragilis*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila* i *Proteus mirabilis* zawierają fosfolipazę C, proteazę, proelastazę, cytolizynę, hemolizynę, toksynę Shiga czy cytotoksynę Vac A [2, 18, 26, 36, 37, 66, 73]. W pęcherzykach *Campylobacter jejuni* zidentyfikowano czynnik CDT (cytoletalna toksyna rozciągająca, ang. cytolethal distending toxin) w formie aktywnej [43]. Wykazano, że czynniki wirulencji mogą stanowić nawet połowę białek obecnych w pęcherzykach błonowych [68].

Otoczenie czynników wirulencji podwójną błoną pęcherzyka umożliwia ich koncentrację i dostarczenie bezpośrednio do infekowanych komórek, a dodatkowo chroni je przed degradacją proteolityczną. Jest to dużo bardziej efektywny sposób patogenez, niż bierne uwalnianie czynników wirulencji do środowiska, gdzie mogą być szybko inaktywowane przez enzymy zainfekowanego organizmu [5].

Białka odporne na działanie enzymów proteolitycznych mogą być przenoszone na powierzchni pęcherzyków. W ten sposób transportowana jest ciepłolabilna enterotoksyna LT syntetyzowana przez enterotoksynogenny szczep *E. coli*, która łączy się z łańcuchami LPS zlokalizowanymi na powierzchni błony pęcherzyka [14].

OMV mogą chronić bakterie patogenne przed systemem odpornościowym gospodarza. Tak jest w przypadku *Legionella pneumophila*, która po sfagocytowaniu przez komórkę makrofaga wytwarza pęcherzyki błonowe uniemożliwiające fuzję powstałego fagosomu z lizosomem [18].

Obecnie wiadomo, że pęcherzyki błonowe to niezależne czynniki wirulencji wywołujące u infekowanych organizmów reakcję immunologiczną [1, 6, 15, 17, 58, 59]. Wykazano, że pęcherzyki błonowe takich bakterii jak: *Moraxella catarrhalis*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria meningitidis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *E. coli* zawierają antygeny typowe dla komórek je wytwarzających, rozpoznawane przez układ odpornościowy gospodarza. W ostatnich latach zaproponowano wykorzystanie pęcherzyków błonowych jako bezpiecznej szczepionki [7, 32]. Prowadzi się badania nad szczepionką przeciw meningokokowemu zapaleniu opon mózgowo rdzeniowych i krztuścowi wywołanym przez odpowiednio: *N. meningitidis* [3, 9, 19, 56, 57, 60] i *Bordetella pertussis* [63].

3.2. Przenoszenie czynników bakteriobójczych

Pęcherzyki błonowe są wykorzystywane do transportu autolizyn, które w syntetyzującej je komórce biorą udział w przebudowie ściany komórkowej, ale mogą być również wykorzystywane w walce z innymi bakteriami [5]. Autolizyny obecne w pęcherzykach błonowych hydrolizują ścianę komórkową zarówno bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich, ale mechanizm degradacji mureiny u obu tych grup mikroorganizmów jest odmienny [27]. Przypuszcza się, że skuteczność działania autolizyn zależy od chemotypu peptydoglikanu atakowanej komórki. Autolizyny najskuteczniej hydrolizują peptydoglikan o chemotypie identycznym lub zbliżonym do syntetyzujących je komórek [5].

W przypadku bakterii Gram-ujemnych pęcherzyki błonowe zawierające autolizynę łączą się z błoną zewnętrzną atakowanej komórki i uwalniają swoją zawartość do jej peryplazmy [27]. Autolizyna dyfunduje w przestrzeni peryplazmatycznej otaczając protoplast i jednocześnie w wielu miejscach rozpoczyna hydrolyzę warstwy mureiny prowadząc do lizy atakowanej komórki [5].

Bakterie Gram-dodatnie nie posiadają błony wewnętrznej, z którą mógłby się połączyć pęcherzyk. Atak na ścianę komórkową tych bakterii rozpoczyna się od adhezji pęcherzyka do powierzchni komórki, uwolnienia autolizyny i miejscowej degradacji warstwy peptydoglikanu, która również kończy się lizą atakowanej komórki. W ten sam sposób zachodzi hydrolyza ściany komórkowej bakterii pokrytej dodatkowo warstwą S, autolizyna najpierw penetruje warstwę S, po czym degradowuje mureinę [29].

Opisane procesy lizy komórek zachodzą w ubogim środowisku, przy niedoborze substancji odżywczych [42]. Intensywnie rosnące i dzielące się komórki bakteryjne są w stanie szybko naprawić ubytki spowodowane działaniem zewnątrzkomórkowych autolizyn,

m.in. dzięki bardzo intensywnie zachodzącej u nich przebudowie ściany komórkowej [5]. Beveridge i Kadurugama [4] zakładają, że czynnikiem przyczyniającym się do wzrostu intensywności wytwarzania pęcherzyków błonowych przez bakterie jest znaczny spadek ilości substancji odżywczych w środowisku. W takich warunkach pęcherzyki zawierające autolizynę umożliwiają eliminację konkurencji, a zdegradowane obce komórki dostarczają bakteriom wytwarzającym OMV związki odżywcze [48]. Jednocześnie uwalniane autolizyny nie zagrażają bakteriom tego samego szczepu, gdyż są identyczne z ich własnymi autolizynami i komórki posiadają zdolność regulacji ich stężenia [5]. Opisano przede wszystkim autolizyny wytwarzane przez *P. aeruginosa*, ale także 15 innych szczepów bakterii Gram-ujemnych [41, 42].

3.3. Inaktywacja antybiotyków

Badania Ciofu i wsp. [8] wykazały, że szczep *P. aeruginosa* oporny na działanie antybiotyków β -laktamowych wytwarza pęcherzyki błonowe zawierające β -laktamazy. W komórce bakteryjnej enzymy te zlokalizowane są w przestrzeni peryplazmatycznej, gdzie hydrolizują antybiotyki z grupy β -laktamów. Okazało się, że β -laktamazy mogą dostawać się do wnętrza tworzących się pęcherzyków i razem z nimi zostać uwolnione do środowiska. Błona OMV, podobnie jak błona zewnętrzna bakterii, zawiera poryny tworzące kanały dyfuzyjne, dlatego antybiotyki β -laktamowe obecne w środowisku mogą dyfundować do wnętrza pęcherzyków i inaktywowane przez obecne w nich β -laktamazy. W tym przypadku pęcherzyki stanowią pierwszą linię obrony przed działaniem antybiotyków β -laktamowych na komórki *P. aeruginosa* [8]. Udowodniono, że OMV uwolnione przez jedną bakterię Gram-ujemną (dawcę) mogą ulegać fuzji z błoną zewnętrzną innej Gram-ujemnej bakterii (biorcy), jednocześnie wprowadzając swoją zawartość do peryplazmy biorcy [29]. W ten sposób β -laktamazy mogą być przekazywane do komórek bakteryjnych nie posiadających zdolności syntezy tych enzymów [5]. Jako pierwszy zjawisko to zaobserwował Beveridge [5] badając fizyczny transfer β -laktamaz z komórek *P. aeruginosa* do komórek *Burkholderia cepacia*.

Kadurugama i Beveridge [26] udowodnili, że dodatek gentamycyny do hodowli *P. aeruginosa* powoduje u tej bakterii trzykrotny wzrost intensywności wytwarzania pęcherzyków błonowych. Ma to związek z funkcją, jaką pełnią OMV w obecności gentamycyny. Pęcherzyki błonowe wyłapują cząsteczki antybiotyku, co przyczynia się do zmniejszenia stężenia gentamycyny w środowisku i ochrony komórek *P. aeruginosa* przed jej bakteriobójczym działaniem.

3.4. Transfer DNA

W pęcherzykach błonowych wytwarzanych przez Gram-ujemne bakterie wykryto DNA plazmidowy, chromosomowy oraz bakteriofagowy [62]. Za pośrednictwem pęcherzyków błonowych mikroorganizmy mogą przekazywać swój materiał genetyczny, a także pobierać obcy DNA. Materiał genetyczny zidentyfikowano w pęcherzykach *Neisseria gonorrhoeae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* O157:H7 i *Avibacterium paragallinarum* [11, 26, 35, 61, 77]. Na przykład wykazano, że pęcherzyki błonowe u *N. gonorrhoeae* zawierały plazmid o wielkości 7,1 kpb niosący geny oporności na penicylinę [62].

Przypuszcza się, że zanim kwas nukleinowy zostanie umieszczony w pęcherzyku, musi zostać przetransportowany z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej komórki, jednak mechanizm tego procesu nie został jeszcze wyjaśniony [62]. Uwolniony przez bakterię pęcherzyk jest zdolny do pobrania egzogennej DNA obecnego w środowisku [62]. DNA wykrywa się nie tylko we wnętrzu pęcherzyków błonowych, ale również na ich powierzchni [65].

Pęcherzyki błonowe mogą stanowić dla bakterii wektor bezpiecznie przenoszący materiał genetyczny i zwiększający sukces transformacji. Błona pęcherzyka pełni w tym przypadku podwójną funkcję: chroni DNA przed nukleazami, a także podczas fuzji z błoną zewnętrzną bakterii-biorcy umożliwia dostarczenie DNA do wnętrza komórki [62]. Yaron i wsp. [77] udowodnili, że pęcherzyki zawierające plazmidowy DNA pochodzący z *E. coli* mogą ulegać fuzji z błoną zewnętrzną komórek *E. coli* nie posiadających tego plazmidu. Wyniki badań Yaron i wsp. [77] wykazały, że materiał genetyczny może być przekazywany za pomocą OMV w obrębie rodziny *Enterobacteriaceae*, a zlokalizowane na plazmidzie geny (w tym przypadku gen oporności na ampicylinę i gen kodujący białko GFP) ulegają ekspresji w komórkach biorcy. Przypuszcza się, że pęcherzyki błonowe stanowią, obok transformacji, transdukcji i koniugacji, alternatywny mechanizm transferu DNA [77].

Opisane zjawisko stwarza możliwość pobierania DNA ze środowiska przez Gram-ujemne niekompetentne komórki, takie jak *E. coli*, i omięcia bariery związanej z nieprzepuszczalnością osłon komórkowych [62]. Wśród plazmidów przenoszonych przez pęcherzyki błonowe mogą być również te nie posiadające genów *tra* tworzących moduł odpowiedzialny za transfer koniugacyjny plazmidu. Plazmid pozbawiony tego modułu nie może być przekazywany bezpośrednio z komórki do komórki, gdyż nie posiada genów warunkujących pierwszy etap procesu koniugacji, czyli utworzenia kontaktu dawcy z biorcą.

Yaron i wsp. [77] udowodnili, że plazmidy o fenotypie Tra^- mogą być przekazywane za pośrednictwem pęcherzyków błonowych.

3.5. Degradacja wielkocząsteczkowych związków organicznych

Mało wiadomo na temat enzymów obecnych w pęcherzykach błonowych, które uczestniczą w przekształcaniu związków obecnych w środowisku. Przypuszcza się, że struktury te mogą przenosić nukleazy, sacharydazy, czy epimerazy [65]. Dowiedziono, że niektóre transportowane w pęcherzykach enzymy wspomagają bakterie w zdobywaniu niezbędnych składników odżywczych. Potwierdzają to badania Forsberg i wsp. [20] dotyczące pęcherzyków błonowych tworzonych przez bakterie *B. succinogenes* zasiedlające żwacz bydła. Wspomniane mikroorganizmy należą do bakterii celulolitycznych i charakteryzują się wysoką efektywnością degradacji trudnorozkładalnych polimerów (celulozy, hemicelulozy, pektyn) wykorzystywanych, jako źródło węgla. Jest to związane z uwalnianymi przez *B. succinogenes* pęcherzykami błonowymi, które zawierają celulazy, ksylanazy i endoglukanazy skutecznie hydrolizujące polimery celulozy. Wyniki badań Forsberg i wsp. [20] wykazały, że ponad 50% enzymów celulolitycznych uwalnianych przez bakterie jest transportowanych w pęcherzykach. Pęcherzyki obecne są w medium pomiędzy komórkami bakterii celulolitycznych, a także ulegają adhezji do włókien polimerów oddalonych od komórek zwiększając tym samym efektywność degradacji [20]. Thompson i wsp. [71] przypuszczają, że *Pseudomonas fragi*, bakteria odpowiedzialna za rozkład mięsa, wytwarza OMV zawierające enzymy proteolityczne. Naukowcy zaobserwowali pozytywną korelację między ilością wytwarzanych pęcherzyków, a aktywnością proteolityczną szczepu *P. fragi*, przy czym bakterie nie syntetyzowały zewnątrzkomórkowych proteaz i nie uwalniały OMV w bogatym środowisku, dostarczającym im wszystkich niezbędnych składników odżywczych w postaci drobnocząsteczkowych związków [71]. Kolejnym przykładem jest udział pęcherzyków błonowych w degradacji węglowodorów. Wykazano, że szczep *Acinetobacter* sp. HO1-N pobiera heksadekan do komórki za pośrednictwem pęcherzyków błonowych [31].

3.6. Interakcje z metalami

Wykazano, że mikroorganizmy dysymilacyjnie redukujące Fe(III) z rodzaju *Geobacter* oraz gatunek *Acidiphilium cryptum* produkują pęcherzyki błonowe w czasie wzrostu na podłożu zawierającym Fe(III).

Przypuszcza się, że rola pęcherzyków polega na zwiększeniu powierzchni kontaktu komórki z nierozpuszczalnymi wodorotlenkami żelaza, które są wykorzystywane jako akceptory elektronów [38, 67].

Wyniki badań dotyczących pęcherzyków błonowych wyizolowanych z hodowli *Shewanella* sp. wykazały, że struktury te wspomagają komórki bakteryjne w redukcji utlenionych nieorganicznych związków niektórych metali [23]. Ustalono, że OMV są zdolne do redukcji żelaza, uranu i technetu w obecności wodoru jako donora elektronów. Redukcja metali zachodzi na powierzchni pęcherzyków i odbywa się przy udziale obecnych w ich błonie cytochromów [23].

Ponadto, naukowcy zaobserwowali, że na powierzchni komórek *Shewanella* sp. hodowanych w pH 7 lub wyższym, pojawiają się obszary wielkości około 50 nm naładowane ujemnie [69]. Miejsca te pokrywają się z miejscami na powierzchni komórki, w których tworzą się pęcherzyki błonowe. Te ujemnie naładowane fragmenty błony bakteryjnej przyciągają dodatkowo naładowane kationy, np. jony Fe(II) powstające w czasie oddychania żelazowego. Okazało się, że obecność Fe(II) zaadsorbowanego na powierzchni komórek, wywiera negatywny wpływ na wzrost hodowli, a także na redukcję Fe(III) [44]. Bakterie pokryte jonami Fe(II) po trzydziestu godzinach inkubacji zaczynają produkować pęcherzyki błonowe uwalniając się jednocześnie od pokrywającego ich powierzchnię żelaza. Przypuszcza się, że tworzenie pęcherzyków błonowych pozwala na usunięcie z powierzchni komórki zaadsorbowanych kationów uniemożliwiających normalny wzrost [23].

3.7. Pęcherzyki błonowe jako składnik biofilmu bakteryjnego

Mikroorganizmy rzadko występują w postaci swobodnie pływających komórek, większość z nich żyje w osiadłych społecznościach nieodwracalnie związanych z podłożem, otoczonych polisacharydową matriks. Biofilmy powstają w najróżniejszych warunkach środowiska, mogą tworzyć się na niemal każdej powierzchni stałej, a także na granicy faz, np. woda-powietrze. Bakterie patogenne również kolonizują organizm rosnąc w postaci biofilmu. Bardzo ważnym składnikiem biofilmu jest matriks – wytwarzana przez komórki bakteryjne macierz zewnątrzkomórkowa, spajająca całą strukturę i chroniąca znajdujące się w niej mikroorganizmy. W skład macierzy wchodzi zewnątrzkomórkowe polisacharydy tworzące rusztowanie biofilmu, białka, lipidy oraz DNA [65]. W biofilmach tworzonych m.in. przez Gram-ujemne bakterie mogą znajdować się również pęcherzyki błonowe. Struktury te izolowano z biofilmów powstałych za-

równy w warunkach naturalnych, jak i laboratoryjnych, tworzonych przez różne mikroorganizmy, takie jak *P. aeruginosa*, *S. oneidensis*, *E. coli*, *Azotobacter* sp. oraz *H. pylori* [64, 78].

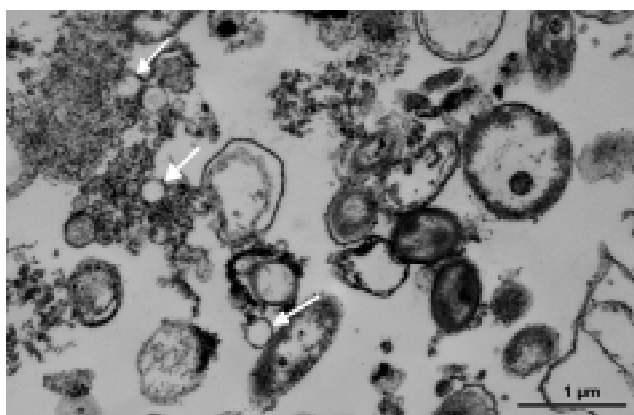
OMV uwalnianie przez bakterie tworzące biofilm najprawdopodobniej są źródłem podstawowych składników macierzy zewnątrzkomórkowej. *Whitchurch* i wsp., [75] sugerują, że DNA, który jest niezbędny do powstania biofilmu *P. aeruginosa* i stanowi jego znaczną część pochodzi właśnie z pęcherzyków błonowych. *Schooling* i wsp. [64] przypuszczają, że pęcherzyki są też źródłem LPS pełniącego funkcje strukturalne biofilmu. Dowiedziono, że OMV biorą udział w agregacji pojedynczych komórek [12, 30, 51]. *B. gingivalis*, bakteria zasiedlająca jamę ustną, tworzy pęcherzyki, które „zlepiają” nie tylko jej własne komórki, ale także komórki innych współwystępujących w środowisku mikroorganizmów m.in. *Capnocytophaga ochracea*, *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp. [24, 30]. *Schooling* i *Beveridge* [64] sugerują, że potencjalną rolą pęcherzyków błonowych może być udział w pierwszych etapach powstawania biofilmu poprzez agregację pojedynczych komórek oraz ułatwianie ich adhezji do podłoża.

Wzrost biofilmu kontrolowany jest przez procesy wyczuwania liczebności (quorum sensing). Bakterie uwalniają do środowiska zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe, zwane autoinduktorami i jednocześnie odbierają sygnały od innych bakterii. Umożliwia to mikroorganizmom monitorowanie gęstości populacji biofilmu i dostosowanie do niej ekspresji genów. *Mashburn* i *Whiteley* [45] udowodnili, że związki sygnałowe, takie jak 2-heptylo-3-hydrokso-4-chinolon (PQS), mogą być przenoszone przez pęcherzyki błonowe *P. aeruginosa*. Ma to duże znaczenie w przypadku związków silnie hydrofobowych, których rozprzestrzenianie w polarnej matriks biofilmu jest utrudnione. Przypuszcza się również, że związki sygnałowe AHLs (acyl-homoserine lactone signals) innych Gram-ujemnych bakterii, takich jak *Rhodobacter capsulatus* i *Sinorhizobium meliloti* także mogą być transportowane w pęcherzykach błonowych [46].

Biofilm stanowi swoisty rezerwuar pęcherzyków błonowych, które pełnią swoje funkcje w jego obrębie, ale także migrują poza jego granice ułatwiając kolonizację środowiska [64].

4. Podsumowanie

W ciągu ostatnich 10 lat wzrosło zainteresowanie pęcherzykami błonowymi. Wciąż są opisywane nowe mikroorganizmy zdolne do produkcji tych struktur zewnątrzkomórkowych. Dodatkowo odkrywano nowe



Rys. 2. Kolonizacja powierzchni miedzionośnego łupka bitumicznego przez mieszaninę bakterii autochtonicznych wyizolowanych z kopalni miedzi Lubin. Widoczne liczne pęcherzyki błonowe budujące macierz biofilmu (strzałka).

funkcje, które mogą one pełnić. Szczególnym zaskoczeniem jest rola pęcherzyków błonowych w przeniesieniu materiału genetycznego i pytanie czy możemy to zjawisko uznać za kolejny mechanizm horyzontalnego transferu genów. Bardzo interesująca wydaje się również rola pęcherzyków błonowych w komunikacji międzygatunkowej, w tym z komórkami eukariotycznymi.

Jak wspomniano wcześniej, pęcherzyki błonowe biorą udział w procesie patogenezy organizmów eukariotycznych. Dodatkowo, przypuszcza się, że mogą one pośredniczyć w komunikacji z tymi organizmami. Przykładem jest symbioza bakterii wiążących azot atmosferyczny *Rhizobium* sp. i roślin motylkowych. Według Goethart i wsp. [21] prawdopodobnie bakterie transportują czynniki Nod odpowiedzialne za tworzenie brodawek właśnie w pęcherzykach błonowych, które są zdolne do interakcji z komórkami roślinnymi.

Jak wspomniano we wprowadzeniu szczególnie uważa badacze skupia się wokół bakterii patogennych. Tymczasem również bakterie występujące w wielu środowiskach zarówno naturalnych, jak i antropogenicznych są zdolne do produkcji pęcherzyków błonowych i ich funkcja wydaje się być szczególnie interesująca.

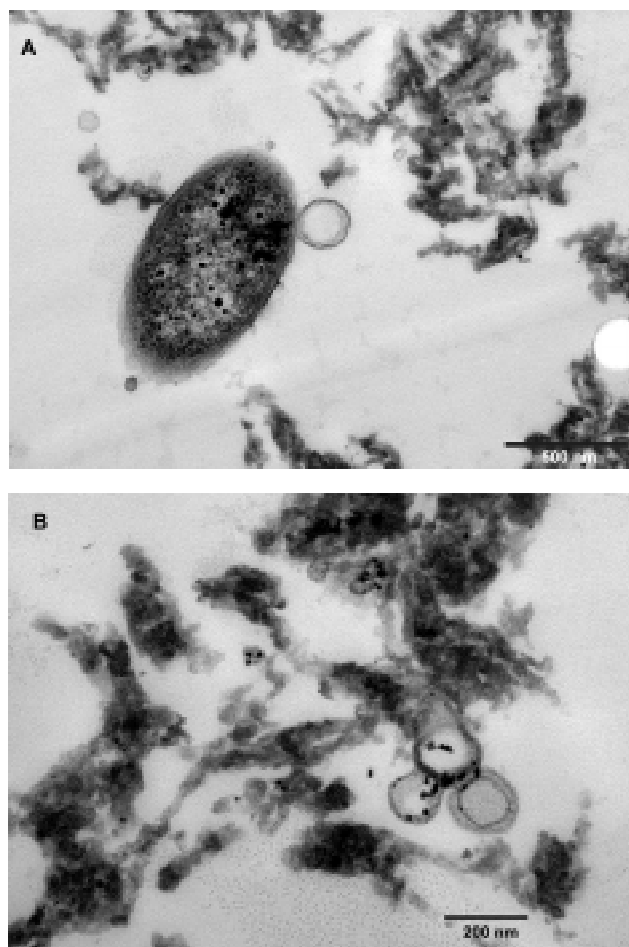
Kolejnym niezwykle istotnym zagadnieniem poruszonym przez Mashburn i wsp. [47] jest pytanie czy nanobakterie obserwowane na powierzchni kalcytu i trawertynu to nie pęcherzyki błonowe? Pytanie to jednak wciąż pozostaje bez odpowiedzi.

Ostatnie badania potwierdziły zdolność do tworzenia pęcherzyków błonowych przez bakterie wyizolowane ze złóż miedzionośnego łupka bitumicznego występującego na obszarze Monokliny Przedsudeckiej. Bakterie autochtoniczne wyizolowane z kopalni miedzi Lubin są zdolne do degradacji materii organicznej łupka oraz mobilizacji metali i metaloidów występujących w złożu [50]. Wykazano, że mikroorganizmy autochtoniczne kolonizują powierzchnię łupka bitu-

micznego tworząc biofilm złożony z pęcherzyków błonowych (Rys. 2). Wśród badanych mikroorganizmów są szczepy *Pseudomonas* sp. LM8 oraz *Acinetobacter* sp. LM3. Rola pęcherzyków u tych bakterii nie została dotychczas poznana, aczkolwiek przypuszcza się, że mogą one mieć znaczenie w procesach degradacji związków organicznych występujących w łupku, takich jak m.in. długołańcuchowe węglowodory alifatyczne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne czy geoporfiryny.

Podobne zjawisko tworzenia biofilmów zaobserwowano w czasie badań biodegradacji metaloporfiryn przez mikroorganizmy. Również w tym przypadku proces degradacji jest poprzedzony kolonizacją powierzchni porfiryń i wytwarzaniem znacznych ilości pęcherzyków błonowych (Rys. 3).

Poznanie roli pęcherzyków błonowych w procesach biotransformacji metalonośnego łupka bitumicznego, jak również biodegradacji metaloporfiryn jest istotne nie tylko ze względu na zrozumienie fizjologii badanych mikroorganizmów, ale również może mieć potencjalne znaczenie aplikacyjne.



Rys. 3. Biofilm powstały w czasie wzrostu szczepu *Pseudomonas* sp. LM8 na podłożu mineralnym z porfiryń wanadową. (A) Komórka bakteryjna tworząca pęcherzyk. (B) Pęcherzyki błonowe znajdujące się w macierzy biofilmu.

Podziękowania

Zdjęcia zamieszczone w pracy autorzy wykonali w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, IBD PAN w Warszawie. Wykorzystano mikroskop elektronowy JEM 1400 (JEOL Co., Japonia 2008). Zestaw aparatury został zakupiony z funduszy strukturalnych UE w ramach projektu CZT BIM – Wyposażenie Laboratorium Obrazowania Biologicznego i Medycznego.

Piśmiennictwo

- Alaniz R., Deatherage B.L., Lara J.C., Cookson B.T.: Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity *in vivo*. *J. Immunol.* **179**, 7692–7701 (2007)
- Amano A., Takeuchi H., Fututa N.: Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions. *Microb. Infect.* **12**, 791–798 (2010)
- Arigita C., Jiskoot W., Westdijk J., van Ingen C., Hennink W.E., Crommelin D.J., Kersten G.F.: Stability of mono- and trivalent meningococcal outer membrane vesicle vaccines. *Vaccine*, **22**, 629–642 (2004)
- Beveridge T.J., Kadurugamuwa J.L.: Periplasm, periplasmic spaces, and their relation to bacterial wall structure: novel secretion of selected periplasmic proteins from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Drug Resist.* **2**, 1–8 (1996)
- Beveridge T.J.: Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725–4733 (1999)
- Bishop A.L., Schild S., Patimalla B., Klein B., Camilli A.: Mucosal immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles provides maternal protection mediated by anti-lipopolysaccharide antibodies that inhibit bacterial motility. *Infect. Immun.* **78**, 4402–4420 (2010)
- Chen D.J., Osterrieder N., Metzger S.M., Buckles E., Doody A.M., DeLisa M.P., Putnam D.: Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines. *PNAS* doi: 10.1073/pnas.0805532107 (2010)
- Ciofu O., Beveridge T.J., Kadurugamuwa J., Walther-Rasmussen J., Hoiby N.: Chromosomal β -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 9–13 (2000)
- Claassen I., Poolman J., i wsp.: Production, characterization and control of *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. *Vaccine*, **14**, 1001–1008 (1996)
- Deatherage B.L., Lara J.C., Bergsbaken T., Rassoulian Barrett S.L., Lara S., Cookson B.T.: Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* **72**, 1395–1407 (2009)
- Dorward D.W., Garon C. F., Judd R. C.: Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **171**, 2499–2505 (1989)
- Ellen R.P., Grove D.A.: *Bacteroides gingivalis* vesicles bind to and aggregate *Actinomyces viscosus*. *Infect. Immun.* **57**, 1618–1620 (1989)
- Ellen, A.F., Albers S.V., Huibers W., Pitcher A., Hobel C.F., Schwarz H., Folea M., Schouten S., Boekema E.J., Poolman B., Driessen A.J.: Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components. *Extremophiles*, **13**, 67–79 (2009)
- Ellis T.N., Kuehn M.J.: Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 81–94 (2010)
- Ellis T.N., Leiman S.A., Kuehn M.J.: Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components. *Infect. Immun.* **78**, 3822–3831 (2010)
- Eriksson S., Lucchini S., Thompson A., Rhen M., Hinton J.C.: Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **47**, 103–118 (2003)
- Feiring B., I wsp.: Persisting immune responses indicating long-term protection after booster dose with meningococcal group B outer membrane vesicle vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 790–796 (2006)
- Fernandez-Moreira E., Helbig J.H., Swanson M.S.: Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infect. Immun.* **74**, 3285–3295 (2006)
- Findlow J., Miller E.: Comparison and correlation of *Neisseria meningitidis* serogroup B immunologic assay results and human antibody responses following three doses of the Norwegian meningococcal outer membrane vesicle vaccine MenBvac. *Infect. Immun.* **74**, 4557–4565 (2006)
- Forsberg, C.W., Beveridge T.J., Hellstrom A.: Cellulase and xylanase release from *Bacteroides succinogenes* and its importance in the rumen environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 886–896 (1981)
- Goethart J., Rohrig H., Hink M.A., van Hoek A., Visser A.J., Bisseling T., Gadella T.W.: Nod factors integrate spontaneously in biomembranes and transfer rapidly between membranes and to root hairs, but transbilayer flip-flop does not occur. *Biochemistry*, **38**, 10898–10907 (1999)
- Goodell E.W., Higgins C.F.: Uptake of cell wallpeptides by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **196**, 3861–3865 (1987)
- Gorby Y., McLean J., Korenevsky A., Rosso K., El-Naggar M.Y., Beveridge T.J.: Redox-reactive membrane vesicles produced by *Shewanella*. *Geobiology*, **6**, 232–241 (2008)
- Grenier D., Mayrand D.: Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun.* **55**, 111–117 (1987)
- Horstman A.L., Kuehn M.J.: Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 32538–32545 (2002)
- Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J.: Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* **177**, 3998–4008 (1995)
- Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J.: Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J. Bacteriol.* **178**, 2767–2774 (1996)
- Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J.: Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 615–621 (1997)
- Kadurugamuwa J.L., Mayer A., Messner P., Sára M., Sleytr U.B., Beveridge T.J.: S-layered *Aneurinibacillus* and *Bacillus* spp. are susceptible to the lytic action of

- Pseudomonas aeruginosa* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **180**, 2306–2311 (1998)
30. Kamaguchi A., Nakayama K., Ichiyama S., Nakamura R., Watanabe T., Ohta M., Baba H., Ohya T.: Effect of *Porphyromonas gingivalis* vesicles on *Staphylococcus aureus* aggregation to oral microorganisms. *Curr. Microbiol.* **47**, 485–491 (2003)
 31. Kappeli O., Finnerty R.: Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *J. Bacteriol.* **140**, 707–712 (1979)
 32. Kim J.Y., Doody A.M., Chen D.J., Cremona G.H., Shuler M.L., Putnam D., DeLisa M.P.: Engineered bacterial outer membrane vesicles with enhanced functionality. *J. Mol. Biol.* **380**, 51–66 (2008)
 33. Kesty N.C., Kuehn M.J.: Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **279**, 2069–2076 (2004)
 34. Knox K.W., Vesik M., Work E.: Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structure of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **92**, 1206–1271 (1966)
 35. Kolling G.L., Matthews K.R.: Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1843–1848 (1999)
 36. Kouokam J.C., Wai S.N.: Outer membrane vesicle-mediated export of pore-forming cytotoxin from *Escherichia coli*. *Toxin Rev.* **23**, 31–46 (2006)
 37. Kuehn M.J., Kesty N.C.: Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* **19**, 2645–2655 (2005)
 38. Kusel K., Dorsch T., Acker G., Stackebrandt E.: Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3633–3640 (1997)
 39. Lai C.H., Listgarten M.A.: Hammond B.F., Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontal Res.* **16**, 379–389 (1981)
 40. Lee E.Y., Choi D.Y., Kim D.K., Kim J.W., Park J.O., Kim S., Kim S.H., Desiderio D.M., Kim Y.K., Kim K.P., Gho Y.S.: Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics*, **9**, 5425–5436 (2009)
 41. Li Z., Clarke A.J., Beveridge T.J.: A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: subcellular distribution, potential role in cell growth and division and secretion in surface membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **178**, 2479–2488 (1996)
 42. Li Z., Clarke A.J., Beveridge T.J.: Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J. Bacteriol.* **180**, 5478–5483 (1998)
 43. Lindmark B., Rompikuntal P.K., Vaitkevicius K., Song T., Mizunoe Y., Uhlin B.E., Guerry P., Wai S.N.: Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* **9**, 220–230 (2009)
 44. Liu, C., Zachara J.M., Gorby Y.A., Szecsody J.E., Brown C.F.: Microbial reduction of Fe(III) and sorption/precipitation of Fe(II) on *Shewanella putrefaciens* strain CN32. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 1385–1393 (2001)
 45. Mashburn L.M., Whiteley M.: Membrane vesicle traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, **437**, 422–425 (2005)
 46. Mashburn L.M., Whiteley M.: Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **61**, 839–846 (2006)
 47. Mashburn L.M., McLean J.C., Whiteley M.: Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. *Geobiology*, **6**, 214–219 (2008)
 48. Mashburn L.M., Jett A.M., Akins D.R., Whiteley M.: *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. *J. Bacteriol.* **187**, 554–566 (2005)
 49. Mashburn-Warren L., Howe J., Garidel P., Richter W., Steiniger F., Roessle M., Brandenburg K., Whiteley M.: Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Mol. Microbiol.* **69**, 491–502 (2008)
 50. Matlakowska, R., Narkiewicz, W., Skłodowska, A.: Bio-transformation of organic-rich copper bearing black shale ore by indigenous microorganisms isolated from Lubin copper mine (Poland). *Environ. Sci. Technol.* **44**, 2433–2440 (2010)
 51. Mayrand D., Grenier D.: Biological activities of outer membrane vesicles. *Can. J. Microbiol.* **35**, 607–613 (1989)
 52. McBroom A.J., Johnson A.P., Vemulapalli S., Kuehn M.J.: Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J. Bacteriol.* **188**, 5385–5392 (2006)
 53. McBroom A.J., Kuehn M.J.: Release of outer membrane vesicles by gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol. Microbiol.* **63**, 545–558 (2007)
 54. Miller S.I., Bader M., Guina T.: Bacterial Vesicle Formation as a Mechanism of Protein Transfer to Animals. *Cell*, **115**, 2–3 (2003)
 55. Näther, D.J., Rachel, R.: The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 199–203 (2004)
 56. Norheim G., Arne Hoiby E., Caugant D.A., Namork E., Tangen T., Fritssoon E., Rosenqvist E.: Immunogenicity and bactericidal activity in mice of an outer membrane protein vesicle vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroup A disease. *Vaccine*, **22**, 2171–2180 (2004)
 57. Oster P., Lennon D., O'Hallahan J., Mulholland K., Reid S., Martin D.: MeNZB: A safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine*, **23**, 2191–2196 (2005)
 58. Park K.S., Choi K.H., Kim Y.S., Kong B.S., Kim O.Y., Kim J.H., Yoon C.M., Koh G.Y., Kim Y.K., Gho Y.S.: Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* induce systemic inflammatory response syndrome. *PLoS One*, **5**, e11334 (2010)
 59. Perez Vidakovic M.L.A., Jendholm J., Morgelin M., Mansson A., Larsson C., Cardell L.O., Riesbeck K.: B cell activation by outer membrane vesicles—a novel virulence mechanism. *PLoS Pathog.* **6**, e1000724 (2010)
 60. Perrett K.P., Pollard A.J.: Towards an improved serogroup B *Neisseria meningitidis* vaccine. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2**, 1611–1625 (2005)
 61. Ramón Rocha M.O., García-González O., Pérez-Méndez A., Ibarra-Caballero J., Pérez-Márquez V.M., Vaca S., Negrete-

- Abascal E.: Membrane vesicles released by *Avibacterium paragallinarum* contain putative virulence factors. *FEMS Microbiol. Lett.* **257**, 63–68 (2006)
62. Renelli M., Matias V., Lo R.Y., Beveridge T.J.: DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiol.* **150**, 2161–2169 (2004)
63. Roberts R., Moreno G., Bottero D., Gaillard M.E., Finger-mann M., Graieb A., Rumbo M., Hozbor D.: Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine*, **26**, 4639–4646 (2008)
64. Schooling S.R., Beveridge T.J.: Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.* **188**, 5945–5957 (2006)
65. Schooling S.R., Hubley A., Beveridge T.J.: Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **191**, 4097–4102 (2009)
66. Scorza F.B., Grandi G., i wsp.: Proteomics characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* ?tolR IHE3034 mutant. *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 473–85 (2008)
67. Shelobolina E.S., Lovley D.R. i wsp.: *Geobacter pickeringii* sp. nov., *Geobacter argillaceus* sp. nov. and *Pelosinus fermentans* gen. nov., sp. nov., isolated from subsurface kaolin lenses. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 126–135 (2007)
68. Sidhu V.K., Vorholter F.J., Niehaus K., Watt S.A.: Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *BMC Microbiol.* **8**, 1471–2180 (2008)
69. Sokolov I., Smith D.S., Henderson G.S., Gorby Y.A., Ferris F.G.: Cell surface electrochemical heterogeneity of the Fe(III)-reducing bacteria *Shewanella putrefaciens*. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 341–347 (2001)
70. Tashiro Y., Ichikawa S., Nakajima-Kambe T., Uchiyama H., Nomura N.: *Pseudomonas* quinolone signal affects membrane vesicle production in not only gram-negative but also Gram-positive bacteria. *Microbes. Environ.* **25**, 120–125 (2010)
71. Thompson S.S., Naidu Y.M., Pestka J.J.: Ultrastructural localization of an extracellular protease in *Pseudomonas fragi* by using the peroxidase-antiperoxidase reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1038–1042 (1985)
72. Wai S.N., Takade A., Amako K.: The release of outer membrane vesicles from the strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Immunol.* **39**, 451–456 (1995)
73. Wai S.N., Lindmark B., Söderblom T., Takade A., Westermarck M., Oscarsson J., Jass J., Richter-Dahlfors A., Mizunoe Y., Uhlin B.E.: Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*, **115**, 25–35 (2003)
74. Wensink J., Witholt B.: Outer-membrane vesicles released by normally growing *Escherichia coli* contain very little lipoprotein. *Eur. J. Biochem.* **116**, 331–335 (1981)
75. Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S.: Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, **295**, 1487 (2002)
76. Work E., Knox K.W., Vesik M.: The chemistry and electron microscopy of an extracellular lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **133**, 438–449 (1966)
77. Yaron S., Kolling G.L., Simon L., Matthews K.R.: Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4414–4420 (2000)
78. Yonezawa H., Osaki T., Kurata S., Fukuda M., Kawakami H., Ochiai K., Hanawa T., Kamiya S.: Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol.* **9**, 197–209 (2009)
79. Zhou L., Srisatjaluk R., Justus D.E., Doyle R.J.: On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 223–228 (1998)