

Paweł Krzyżek^{1*}

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wpłynęło w styczniu 2017 r.
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Sekrecja pęcherzyków błonowych u *H. pylori*. 3. Proteom pęcherzyków błonowych *H. pylori*. 4. Transport czynników wirulencji poprzez OMV. 4.1. Toksyna VacA. 4.2. Onkoproteina CagA. 4.3. Inne substancje. 5. Udział OMV w formowaniu biofilmu. 5.1. Funkcje biofilmu. 5.2. Zaangażowanie OMV w tworzenie biofilmu u bakterii. 5.3. Zaangażowanie OMV w tworzenie biofilmu u *H. pylori*. 5.4. Funkcja strukturalna zewnątrzkomórkowego DNA *H. pylori*. 6. Zewnątrzkomórkowe DNA jako nośnik informacji. 6.1. Wpływ na wirulencję. 6.2. Transformacja. 6.3. Naturalna kompetencja *H. pylori*. 7. Podsumowanie

Secretion of outer membrane vesicles as a mechanism promoting *H. pylori* infections

Abstract: *Helicobacter pylori* commonly colonizes the human gastric mucosa. Infections with this microorganism can contribute to serious health consequences, such as peptic ulceration, gastric adenocarcinoma and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Chronic persistence of this bacteria in the host organism is probably strongly dependent on the secretion of outer membrane vesicles (OMV). These organelles are small, electron-dense, extracellular structures which are secreted in large amounts during stressful conditions, among others. *H. pylori* OMV mediate transfer of virulence factors such as toxins and immunomodulatory compounds. They contribute to avoiding a response from the host immune system and inducing chronic gastritis. OMV secretion also affects the formation of cell aggregates, microcolonies and biofilm matrix. Enhanced OMV production is connected to maintenance of direct contact through cell-cell and cell-surface interactions. A key component of OMV, which determines their structural function, is extracellular DNA (eDNA) anchored to the surface of these organelles. eDNA associated with OMV additionally determines the genetic recombination in the process of horizontal gene transfer. *H. pylori* is naturally competent for genetic transformation and is constantly capable of DNA uptake from the environment. The natural competence state promotes the assimilation of eDNA anchored to the OMV surface. This is probably dependent on ComB and ComEC components, which are involved in the transformation process. For this reason, the OMV secretion mediates intensive exchange of genetic material, promotes adaptation to changing environmental conditions and enables persistent infecting of the gastric mucosa by *H. pylori*.

1. Introduction. 2. Secretion of outer membrane vesicles by *H. pylori*. 3. Proteome of *H. pylori* outer membrane vesicles. 4. Transport of virulence factors through OMV. 4.1. Toxin VacA. 4.2. Oncoprotein CagA. 4.3. Other substances. 5. OMV involvement in biofilm formation. 5.1. Functions of biofilm. 5.2. OMV influence on bacterial biofilm formation. 5.3. OMV influence on biofilm formation by *H. pylori*. 5.4. Structural function of *H. pylori* extracellular DNA. 6. Extracellular DNA as an information carrier. 6.1. Influence on virulence. 6.2. Transformation. 6.3. Natural competence of *H. pylori*. 7. Conclusions

Słowa kluczowe: biofilm, czynniki wirulencji, *H. pylori*, pęcherzyki błonowe, transformacja

Key words: biofilm, *H. pylori*, outer membrane vesicles, transformation, virulence factors

1. Wstęp

Pęcherzyki błonowe (OMV, Outer Membrane Vesicles) są strukturami o nanometrycznych wymiarach, które przenoszą różnorodne substancje chemiczne, często nierozpuszczalne lub hydrofobowe [47, 50]. Wśród nich wyróżnić można białka błonowe i cytoplazmatyczne, lipidy, kwasy nukleinowe (RNA i DNA), komponenty ściany komórkowej (LPS i peptydoglikan) oraz drobnocząsteczkowe metabolity wtórne (toksyny, czynniki immunomodulujące, substancje warunkujące *quorum sensing*) [36, 37, 47, 50]. W obrazie mikroskopowym OMV widoczne są jako drobne, sferyczne, gęste elektronowo organelle o wymiarach w zakresie 50–250 nm [36]. Pęcherzyki błonowe warunkują dostarczenie substancji do miejsca docelowego w efek-

tywnym stężeniu oraz ochronę przed czynnikami środowiskowymi, tj. działaniem nukleaz i peptydaz [37, 53]. Pęcherzyki wytwarzane są we wszystkich fazach wzrostu mikroorganizmów i produkowane są zarówno przez bakterie Gram-ujemne, jak i Gram-dodatnie [37, 50]. Dotychczas nie uzyskano mutantów bakterii całkowicie pozbawionych zdolności do sekrecji OMV, co sugeruje, że proces ten zależny jest od wielu genów [37].

Początkowo uważano, że OMV są przypadkowym produktem powstałym w wyniku obrotu katabolicznego ściany komórkowej lub lizy komórki mikroorganizmu. Obecnie są jednak rozpatrywane jako system sekrecji, kluczowy dla fizjologii drobnoustrojów [47, 50, 53]. Wydzielanie pęcherzyków błonowych łączy się z adaptacją mikroorganizmów do niekorzystnych warunków środowiska. Odpowiedź ta polega na promowaniu

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu; ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław; tel. 717 84 12 86; e-mail: krojcerpawel@gmail.com

tworzenia agregatów bakteryjnych i biofilmów oraz usuwaniu antybiotyków, przeciwciał i bakteriofagów z powierzchni komórki przez aktywną sekrecję OMV do środowiska zewnętrznego [53]. Pęcherzyki *Moraxella catarrhalis* mają zdolność łączenia się z przeciwciałami skierowanymi przeciwko bakterii, co warunkuje uniknięcie opsonizacji i bezpośredniego kontaktu drobnoustroju z komórkami odpornościowymi [54]. U mutantów $\Delta yieM$ *Escherichia coli* nadprodukcujących pęcherzyki błonowe, wykazano 10-krotny wzrost sekrecji OMV. Proces ten skorelowany był ze zwiększonymi zdolnościami przetrwania przy traktowaniu mutantów antybiotykami degradującymi błonę komórkową, polimyksyną B i kolistyną. Dodatkowo, inkubacja fagów litycznych T4 z *E. coli*, przy obecności 1 μg OMV, redukowała skuteczność bakteriofagów o 90% [42].

Pęcherzyki błonowe mogą uczestniczyć w transporcie materiału genetycznego, determinującego zachodzenie horyzontalnego transferu genów (HGT), lub związków zaangażowanych w komunikację międzydrobnoustrojową [9, 53]. Kliniczne szczepy *Pseudomonas aeruginosa* izolowane od pacjentów z mukowiscydozą wydzielają przy pomocy OMV silnie hydrofobowe czynniki sygnałowe, związane z wirulencją tego patogenu, tj. 2-heptylo-3-hydroksy-4-chinolon (PQS, *Pseudomonas* Quinolone Signal) [44]. Jednym z pierwszych mikroorganizmów, u których wykazano zdolność do przenoszenia materiału genetycznego przez transport pęcherzykowy był *Haemophilus influenzae*. OMV transportujące DNA wpływało na ochronę kwasu nukleinowego przed nukleazami i enzymami restrykcyjnymi oraz umożliwiało zachodzenie modyfikacji genetycznych. Stąd też nazwane zostały transformasomami (*transformasomes*) [25]. Dziś wiadomo, że pęcherzyki tych bakterii zawierają także inne czynniki wirulencji jak endopeptydaza IgA, lipooligosacharyd (LOS), adhezyna P5 czy białka metabolizmu hemu [59]. U mikroorganizmów wykazano również zdolność do rozpowszechniania genów oporności poprzez pęcherzyki błonowe. Plazmid oporności na penicylinę u *Neisseria gonorrhoeae* może być przenoszony za pośrednictwem OMV na szczepy wrażliwe [12]. Podobnie pęcherzyki błonowe szczepów *Acinetobacter baumannii* produkujących metalo- β -laktamazę, warunkującą oporność na karbapenemy, inicjowały zdolność do rozkładu tych antybiotyków u szczepów wrażliwych tej bakterii [56]. W doświadczeniu Schaar i wsp. [57] wykazano, że OMV wydzielane przez *M. catarrhalis* KR526 zawierały aktywną β -laktamazę i w stężeniu 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kompletnie hydrolizowały 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amoksyliny. Pęcherzyki tego mikroorganizmu wpływały także protekcyjnie względem innych bakterii patogenych układu oddechowego, *H. influenzae* i *Streptococcus pneumoniae*. To sugeruje, że OMV mogą wywierać efekt ochronny względem różnych drobnoustrojów,

bytujących w tej samej niszy ekologicznej, wzmacniając ich zdolności przetrwania.

W niniejszej pracy dokonano przeglądu wiedzy dotyczącej zdolności *Helicobacter pylori* do sekrecji pęcherzyków błonowych. Szczególną uwagę zwrócono na zaangażowanie pęcherzyków w formowanie biofilmu i agregatów bakteryjnych oraz generowanie zmienności genetycznej.

2. Sekrecja pęcherzyków błonowych u *H. pylori*

Do zakażenia *H. pylori* dochodzi najczęściej w dzieciństwie, a objawy kliniczne mogą ujawnić się po wielu latach. Drobnoustrój ten zasiedla śluzówkę żołądka, gdzie zdolny jest do przetrwania mimo stosowanych terapii. Przetrwale infekcje indukują chroniczne zapalenie błony śluzowej żołądka, co łączone jest z rozwojem choroby wrzodowej żołądka lub dwunastnicy oraz nowotworem żołądka [4]. Podobnie jak większość bakterii Gram-ujemnych, *H. pylori* jest zdolny do sekrecji pęcherzyków błonowych, których wielkość mieści się w zakresie 20–300 nm [48]. Mikroorganizm ten nierzadko mimo braku bezpośredniej adhezji do komórek epitelium posiada zdolność inicjowania zapalenia błony śluzowej żołądka [24]. Pęcherzyki błonowe warunkują skuteczne przekraczanie bariery epitelialnej i dostarczenie czynników wirulencji bezpośrednio do komórek docelowych. Taka strategia umożliwia uniknięcie bezpośredniego kontaktu z komórkami gospodarza i ochronę przed szkodliwym działaniem układu odpornościowego [24, 63].

Bakterie *H. pylori* wydzielają OMV w hodowlach płynnych, stałych lub w formie biofilmu, zarówno w warunkach *in vitro* i *in vivo* [31, 53]. Skład oraz ilość pęcherzyków błonowych determinowane są przez fazę wzrostu i czynniki środowiskowe. Zaobserwowano, że *H. pylori* izolowany podczas logarytmicznej fazy wzrostu posiada spiralny kształt i wydziela relatywnie niską ilość OMV, zaś w fazie stacjonarnej przyjmuje kształt kokoidalny, wydzielając duże ilości pęcherzyków [48]. W badaniu Keenan i wsp. [32] wykazano wpływ zmiany stężenia żelaza na ilość i budowę lipopolisacharydu (LPS) w produkowanych pęcherzykach *H. pylori*. U bakterii wzrastających w optymalnych warunkach LPS na powierzchni wydzielanych OMV występował liczniej ($1,94 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{mg}$ białek OMV) niż przy obniżonym stężeniu żelaza ($0,75 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{mg}$ białek OMV). Co więcej, ekspresja terminalnej jednostki Lewis^x w obrębie struktury LPS *H. pylori* była 15-krotnie zredukowana w warunkach obniżonego stężenia żelaza. Bytujący w jamie ustnej *Porphyromonas gingivalis* produkuje dwie formy LPS, różniące się właściwościami łańcucha polisacharydowego: O-LPS (neutralny) i A-LPS (ładunek ujemny). Pęcherzyki

blonowe mutantów *P. gingivalis* o zredukowanej ilości A-LPS, występujące naturalnie w dużych ilościach, posiadały zmieniony profil białek błony zewnętrznej (OMP, Outer Membrane Proteins). Sugeruje to, że LPS może wpływać na skład i proces formowania pęcherzyków [22].

3. Proteom pęcherzyków błonowych *H. pylori*

Białka znajdujące się w OMV posiadają różnorodne funkcje i należą do białek strukturalnych, białek błony zewnętrznej i wewnętrznej, poryn, kanałów jonowych, enzymów cytoplazmatycznych i peryplazmatycznych oraz białek związanych z odpowiedzią mikroorganizmu na stres [37]. W doświadczeniu Mullaney i wsp. [46] oraz Olofsson i wsp. [48] badano proteom pęcherzyków wydzielanych przez *H. pylori*. Dominującą grupę stanowiły białka błony zewnętrznej (31%) i białka cytoplazmatyczne (22%) [46]. W stosunku do proteomu błony zewnętrznej całej komórki bakterii, 77% wszystkich białek tego kompartmentu znajdowało się w obrębie OMV. Sugeruje to, że grupowanie substancji w trakcie formowania pęcherzyków jest procesem selektywnym i nie zachodzi w wyniku biernego oderwania fragmentu błony komórkowej bakterii. Pośród zidentyfikowanych białek w pęcherzykach błonowych *H. pylori* należy wyróżnić cytotosynę VacA, onkoproteinę CagA, podjednostki ureazy, proteazę HtrA, transpeptydazę γ -glutamylową, katalazę, NapA, OipA oraz adhezyny BabA i SabA [46, 48]. W badaniu powinowactwa adhezyn na powierzchni OMV szczepów 17875/Leb (BabA⁺, SabA⁻) i 17875/sLex (BabA⁻, SabA⁺) stwierdzono podobny poziom łączenia z receptorami epitelium śluzówki żołądka w porównaniu z całą komórką bakterii. Wskazuje to na obecność w pełni funkcjonal-

nych i prawidłowo sfałdowanych białek adhezyjnych na powierzchni pęcherzyków błonowych, które warunkują zajście interakcji z komórkami gospodarza i internalizację tych organelli [48]. Co więcej, w doświadczeniu weryfikującym zdolność OMV *H. pylori* do indukcji odpowiedzi zapalnej zaobserwowano wzrost sekrecji prozapalnej cytokiny IL-8 w sposób zależny od dawki pęcherzyków. Aktywność wykazano względem obu testowanych typów komórek, tj. żołądka (AGS) i jelita (T84), natomiast wzrost stężenia IL-8 był 12-15-krotnie wyższy w przypadku linii komórek T84 [46]. Bezpośrednia interakcja OMV *H. pylori* z komórkami gospodarza umożliwia bakterii pozostanie w bezpiecznej odległości, warunkującej ochronę przed działaniem układu odpornościowego i możliwość przetrwałego infekowania śluzówki żołądka. Wydzielanie pęcherzyków błonowych u *H. pylori* jest rozpatrywane jako alternatywny sposób transportu czynników wirulencji, toksyn i związków immunomodulujących, celem pozyskiwania substancji odżywczych oraz interferencji z odpowiedzią gospodarza skierowaną przeciw temu mikroorganizmowi [46, 48, 53] [Tabela I].

4. Transport czynników wirulencji poprzez OMV

Ze względu na silne właściwości adhezyjne pęcherzyków błonowych oraz ich małe rozmiary, organelle te mogą wchodzić w specyficzne interakcje z komórkami gospodarza, w miejscach niedostępnych lub trudno dostępnych dla całej komórki drobnoustroju [36]. Zaobserwowano, że do endocytozy OMV *H. pylori* dochodzi przy pomocy tratw lipidowych, tj. mikrodomen w błonie komórkowej bogatych w sterole i sfingolipidy. Poziom internalizacji uległ znacznemu obniżeniu przy usunięciu cholesterolu z błon komórkowych

Tabela I
Wirulencja *H. pylori* warunkowana sekrecją pęcherzyków błonowych i zależnym od wydzielania OMV transportem eDNA

Adaptacja <i>H. pylori</i>	Efekt działania	Piśmiennictwo
Toksyeczność względem komórek eukariotycznych	Indukowanie podwyższonej sekrecji cytokin prozapalnych	[13, 23]
	Wakolizacja	[27]
	Formowanie mikrojąder	[25]
	Indukcja apoptozy	[27]
	Zaburzenie homeostazy żelazowej	[25]
	Obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu	[25, 29]
	Modyfikowanie proliferacji komórki	[1]
Zdolność chronicznej infekcji	Uniknięcie bezpośredniego kontaktu z komórkami odpowiedzi immunologicznej	[1, 27]
	Pozyskiwanie substancji odżywczych z komórek gospodarza	[1, 13]
	Tworzenie agregatów bakteryjnych i biofilmów	[19, 21, 26]
	Przyleganie do powierzchni abiotycznych	[19]
	Rozprzestrzenianie genów oporności i genów wirulencji	[5, 7]
	Uzyskiwanie nukleotydów i energii przez metabolizm eDNA	[32]

gospodarza oraz przy zastosowaniu filipiny lub metyl- β -cyklodekstryny [27, 49]. Odmienne wyniki uzyskano w doświadczeniu Parker i wsp. [52], gdzie penetracja komórki eukariotycznej przez OMV *H. pylori* odbywała się w sposób niezależny od cholesterolu i zależny od klatryny. Dodatkowo, wykazano że toksyna VacA związana z pęcherzykami promuje proces internalizacji.

4.1. Toksyna VacA

Toksyna wakuolizująca VacA warunkuje tworzenie aniono-selektywnych kanałów w błonach endosomów, co związane jest z wypływem zawartości komórki do środowiska zewnętrznego i poboru niezbędnych substancji przez *H. pylori* [9]. Aktywna biologicznie toksyna VacA może być zlokalizowana na powierzchni pęcherzyków błonowych tych bakterii lub wydzielana na zewnątrz komórki w postaci niezwiązanej [31]. Traktowanie komórek RK13 (komórki nerki królika) dawką 50 $\mu\text{g/ml}$ OMV szczepu toksynogennego *H. pylori* ATCC49503 (VacA⁺) powodowało wakuolizację 49% badanych komórek. Efekt ten był dużo silniejszy niż w kontroli lub po zastosowaniu pęcherzyków mutantów VacA (odpowiednio 4 i 3%) [63]. W doświadczeniu Chitcholtan i wsp. [9] dostrzeżono trzykrotny wzrost formowania mikrojąder w komórkach epitelium żołądka (AGS) traktowanych OMV szczepu *H. pylori* ATCC49503 i brak tego efektu pod wpływem działania pęcherzyków, pochodzących od nietoksynogennych mutantów VacA. Tworzenie mikrojąder miało podobny przebieg zarówno przy inkubacji AGS z całymi komórkami bakterii, jak i wyłącznie z OMV. Co więcej, wykazano że pęcherzyki *H. pylori* wpływają na zaburzenie homeostazy żelazowej komórki i obniżenie poziomu glutationu. Glutation zaś moduluje potencjał oksydacyjno-redukcyjny disiarczków, modyfikując właściwości białek w mikrośrodowisku żołądka, i jest najaktywniej wykorzystywanym substratem transferazy γ -glutamylowej. Limitowanie glutationu przyczynia się do promowania zależnych od stresu oksydacyjnego uszkodzeń komórek śluzówki żołądka i inicjowania procesu karcynogenezy [6].

Ustalono, że białko VacA wzmacnia adhezję pęcherzyków do komórek eukariotycznych poprzez hamowanie mechanizmów zależnych od LPS. Mimo pozytywnej korelacji między obecnością tej toksyny na powierzchni OMV a poziomem internalizacji, VacA nie jest konieczna do skutecznej penetracji błony komórek gospodarza przez pęcherzyki [52]. Wolna, rozpuszczalna forma toksyny VacA jest zdolna do indukowania apoptozy komórek żołądka AGS, natomiast nie w komórkach białaczkowych Jurkat. Pęcherzyki błonowe związane z VacA inicjowały apoptozę tej linii komórek, sugerując zdolność promowania łączenia się OMV z komórkami docelowymi przez toksynę

wakuolizującą [63]. Podobną sytuację zaobserwowano u *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, której toksyna niszcząca leukocyty – leukotoksyna, wykazuje większą aktywność, gdy związana jest z powierzchnią OMV niż z błoną komórkową bakterii. Pęcherzyki szczepów *A. actinomycetemcomitans* JP2, o silnej zdolności do produkcji leukotoksyny, były 5–10-krotnie bardziej toksyczne niż szczepu *A. actinomycetemcomitans* 652 o niskim poziomie produkcji tej substancji [30]. W przypadku pęcherzyków wydzielanych przez enterotoksyczne *E. coli* (ETEC) 95% ciepłochwiejnej toksyny LT związanej jest z powierzchnią OMV [23, 34].

4.2. Onkoproteina CagA

Przykładem innego czynnika wirulencji związanej z powierzchnią pęcherzyków błonowych *H. pylori* jest białko CagA [48]. Proteina ta obecna jest w dwóch formach: ufosforylowanej i nieufosforylowanej. Pierwsza wpływa na zmiany morfologiczne, adhezyjne i wzrost ruchliwości komórek eukariotycznych, druga zaś warunkuje niszczenie połączeń ścisłych między komórkami i oddziałuje na przebieg cyklu komórkowego gospodarza [46]. Białko CagA wykryto w OMV szczepu *H. pylori* J99, u którego brak funkcjonalnego systemu sekrecji typu IV, determinującego translokację tych makromolekuł do komórek gospodarza. Związanie CagA z pęcherzykami może stanowić alternatywny, niezależny od T4SS, sposób przenoszenia tych czynników wirulencji [46, 48]. W badaniach Ismail i wsp. [24] określano wpływ pęcherzyków błonowych izolowanych od dwóch szczepów *H. pylori*, tj. ATCC49503 (CagA⁺) i ATCC51932 (CagA⁻), względem komórek epitelialnych żołądka. Niezależnie od użytej dawki, OMV obu szczepów wpływały na obniżenie żywotności komórek epitelium oraz modyfikację aktywności proliferacji (podwyższenie przy niskich dawkach i obniżenie przy stężeniu $\geq 5 \mu\text{g/ml}$). Różnice zaobserwowano w poziomie indukcji produkcji IL-8 przez komórki epitelium, ponieważ 4-krotnie wyższy poziom zanotowano przy działaniu 50 $\mu\text{g/ml}$ OMV szczepu CagA⁻. Doświadczenie to dowodzi o możliwości aktywnej modulacji odpowiedzi komórek eukariotycznych w sposób niezależny od przylegania bakterii.

4.3. Inne substancje

Substancje efektorowe znajdujące się w obrębie pęcherzyków błonowych łatwiej pokonują barierę komórkową. Są chronione przed czynnikami degradującymi i mogą być dostarczane w skoncentrowanej dawce do miejsca docelowego [63]. Innym czynnikiem związanym z OMV *H. pylori* jest białko NapA, czynnik chemotaktyczny neutrofilii, indukujący wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych (ROS, Reactive

Oxygen Species). Wzrost migracji neutrofilów był skorelowany z dawką użytych OMV. Miał on na celu generowanie stresu oksydacyjnego w komórkach gospodarza i zależne od tego procesu uwolnienie substancji odżywczych dla mikroorganizmów [46]. Bakterie kolonizujące błony śluzowe, wśród nich *H. pylori*, mają zdolność sekrecji peptydoglikanu za pośrednictwem transportu pęcherzykowego. Specyficzne rozpoznanie mureiny przez cytozolowy sensor NOD1 skutkuje wzrostem ilości NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) i indukcją wrodzonej odpowiedzi komórek gospodarza [27].

5. Udział OMV w formowaniu biofilmu

OMV *H. pylori* warunkują w znaczący sposób patogenność tej bakterii. Wpływają na szybkość proliferacji i zmianę morfologii komórek epitelialnych żołądka, indukują formowanie mikrojąder, kierują komórki eukariotyczne na drogę apoptozy oraz stymulują wydzielanie cytokin prozapalnych tj. IL-6 i IL-8 [52]. Przenosząc czynniki wirulencji i modyfikując odpowiedź układu odpornościowego skierowaną przeciw tym drobnoustrojom odgrywają istotną rolę w kolonizowaniu niszy żołądka [36]. Pęcherzyki mogą również pełnić kluczową funkcję w zwiększaniu przeżywalności mikroorganizmów przez promowanie formowania biofilmu.

5.1. Funkcje biofilmu

Populacje bakterii często tworzą wysoce zorganizowane, gęste kompleksy zwane biofilmem [45]. W jego skład wchodzi komórki drobnoustrojów oraz zewnątrzkomórkowa macierz, która stanowi około 90% całej biomasy tej struktury i składa się z różnorodnych substancji, m.in. egzopolisacharydów, białek, lipidów i eDNA (zewnątrzkomórkowego DNA) [13, 58, 67]. Biofilm stanowi środowisko chroniące komórki mikroorganizmów przed niekorzystnymi czynnikami, w tym przed wahaniami temperatury, zmianami pH, promieniowaniem UV, swoistym i nieswoistym działaniem układu odpornościowego gospodarza oraz czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi (enzymy degradujące, antybiotyki) [20, 21]. Co więcej, warunkuje również adhezję, agregację komórek, tworzenie silnie uwodnionego środowiska (ochrona przed wysuszeniem), a także sorpcję związków organicznych i nieorganicznych [13].

5.2. Zaangażowanie OMV w tworzenie biofilmu u różnych drobnoustrojów

W wielu badaniach zaobserwowano występowanie licznych pęcherzyków błonowych w macierzy biofilmu [13, 36, 50, 51, 66, 67]. OMV zaangażowane są

w koagregowanie komórek bakterii, tworzenie mikrokolonii i biowarstwy. W warunkach *in vitro* wykazano aktywny udział pęcherzyków *P. gingivalis* w promowaniu agregacji mikroorganizmów jamy ustnej, tj. *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Staphylococcus aureus* oraz strzępkowej formy *Candida albicans* [26]. Poziom sekrecji pęcherzyków błonowych przez bakterie wzrasta znacznie podczas wystawienia na niekorzystne warunki, sugerując powiązanie procesu formowania biofilmu z wydzielaniem OMV. Uwalnianie pęcherzyków wpływa najprawdopodobniej na zwiększenie hydrofobowości powierzchni mikroorganizmów i wzrost zdolności do tworzenia biowarstwy [37]. U bakterii *Myxococcus xanthus* obserwacja struktury biofilmu wykazała obecność bardzo licznych OMV, znajdujących się praktycznie w każdej wolnej przestrzeni macierzy pozakomórkowej. Pęcherzyki pełniły kluczową rolę w agregacji komórek i stabilizowaniu całej struktury biofilmu, proces ten zaś był warunkowany przez białka OMP obecne na powierzchni pęcherzyków. W niektórych komórkach dostrzeżono drobne deformacje kształtu celem utrzymania kontaktu typu komórka-komórka, co ukazuje, że takie interakcje nie są jedynie wynikiem ścisłego upakowania mikroorganizmów w biofilmie [51].

5.3. Zaangażowanie OMV w tworzenie biofilmu u *H. pylori*

Doświadczenie wskazujące na zaangażowanie pęcherzyków błonowych w promowanie tworzenia biofilmów wykonano także dla *H. pylori*. Yonezawa i wsp. [66] badali zdolności różnych szczepów *H. pylori* do formowania biowarstwy. Biofilmy wszystkich badanych szczepów posiadały relatywnie niską biomasę ($OD_{595} = \sim 0,2$), za wyjątkiem jednego, TK1402 ($OD_{595} = 1,5$). Jest to kliniczny izolat, pochodzący od japońskiego pacjenta z chorobą wrzodową żołądka. Przy dokładnej analizie biofilmu zaobserwowano obecność licznych sferycznych, pęcherzykowatych struktur w macierzy egzopolisacharydu (EPS). Pęcherzyki te sprzyjały ścisłym interakcjom komórkowym i tworzeniu agregatów. Dodatkowo, formowanie biowarstwy innego szczepu *H. pylori* było wzmocnione przy obecności w podłożu OMV pochodzących z hodowli *H. pylori* TK1402. Wykazano również, że obniżona suplementacja podłoża cielęcą surowicą płodową (FCS, Fetal Calf Serum) wpływa linowo na redukcję tworzenia biofilmu u *H. pylori*. W odróżnieniu od podłoża z 7% FCS, w którym szczep TK1402 wydzieliał duże ilości OMV, przy braku suplementacji nie wykryto obecności pęcherzyków. Obserwacja ta ukazuje jak ściśle zdolność formowania biofilmu przez *H. pylori* jest sprzężona z wydzielaniem pęcherzyków błonowych. W kolejnym badaniu Yonezawa i wsp. [67] analizowano skład białkowy pęcherzyków OMV

H. pylori TK1402 i wyizolowano 22 kDa proteinę, której nie odnaleziono w OMV innych szczepów. Białko to było obecne po dwu- i trzydniowej inkubacji szczepu TK1402, ale nie jednodniowej. Z tego powodu wnioskowano o jego istotnej roli w inicjowaniu przylegania do powierzchni abiotycznych, agregacji komórek bakterii i tworzeniu biowarstwy u *H. pylori* TK1402.

Zdolność do formowania ustrukturyzowanego biofilmu i sekrecji licznych pęcherzyków błonowych udowodniono także u środowiskowych szczepów *H. pylori* MDC1, izolowanych z zooplanktonu morskiego. Po 30 dniach inkubacji, w hodowli tej bakterii obserwowano agregaty form kokoidalnych, otoczone przez licznie występującą macierz zewnątrzkomórkową i pęcherzyki błonowe. W badaniu genu *luxS*, warunkującego zależną od autoinduktorów-2 (AI-2) aktywność *quorum sensing*, maksymalną ekspresję tego genu zaobserwowano w drugiej dobie hodowli, zaś w 30 dniu jego ekspresja nieznacznie przekraczała poziom detekcji. Autorzy artykułu sugerowali zmniejszenie ekspresji *luxS* jako rezultat dobrze zorganizowanej społeczności bakterii i zmniejszonej potrzeby komunikowania się [8]. Obecnie wiadomo natomiast, że autoinduktor-2 są czynnikiem rozpraszającym strukturę biofilmu *H. pylori* i stąd też synteza czynników AI-2 osiągała bardzo niski poziom [1].

5.4. Funkcja strukturalna zewnątrzkomórkowego DNA *H. pylori*

Zewnątrzkomórkowe DNA (eDNA) jest ważnym polimerem obecnym w macierzy biofilmu. Komponent ten pełni funkcję architektoniczną i warunkuje odpowiednie rozmieszczenie mikroorganizmów w biowarstwie [15, 60]. Rola strukturalna eDNA została wykazana w wielu doświadczeniach przez redukcję biomasy biofilmów różnych bakterii po traktowaniu DNazą I. W badaniu Grande i wsp. [18] udowodniono jednak, że użycie tego enzymu (0,1 i 1 mg/ml) nie wpływa w żaden sposób na żywotność komórek *H. pylori* ani na biomasę biofilmów. Efekt DNazy I testowano względem kwasów nukleinowych pochodzących od różnych etiologicznie szczepów *H. pylori*, tj. wzorcowym (ATCC43629), klinicznym (SDB60) i środowiskowym (MDC1). Brak aktywności DNazy oraz uzyskanie różnych profili wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego DNA w analizie RAPD PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA) wskazywał na uwalanie kwasu nukleinowego w procesie niezależnym od lizy komórkowej. Co więcej, materiał genetyczny chroniony był przed aktywnością degradacyjną enzymu. Zasugerowano sekrecję eDNA zakotwiczonego w pęcherzykach błonowych. Przypuszczenia te potwierdzili następnie Grande i wsp. [19], którzy ustalili, że *H. pylori* jest zdolny do sekrecji pęcherzyków zarówno

w fazie planktonicznej (pOMV), jak i biofilmowej (bOMV). W analizie właściwości fizykochemicznych pęcherzyków wykazano, że bOMV posiadają większe rozmiary i bardziej ujemny ładunek (293 nm, -30 mV) niż pOMV (124 nm, -25 mV). Silniej ujemny ładunek korelował z 4-krotnie wyższą zawartością kwasu nukleinowego w bOMV. Dodatkowo wykazano, że znacznie większa część bOMV zawierała eDNA (30%) w porównaniu z pOMV (12%), zaś w obu przypadkach związek ten eksponowany był na powierzchni pęcherzyków. Pęcherzyki błonowe determinowały tworzenie wzajemnych połączeń między OMV-OMV oraz OMV-komórka, wspierając hipotezę o pełnieniu przez nie funkcji strukturalnej. Traktowanie zarówno pOMV, jak i bOMV, DNazą I nie wpływało na redukcję stężenia związanego z nimi DNA. Zintegrowanie kwasu nukleinowego z powierzchnią pęcherzyków wywierało efekt ochronny przed działaniem nukleaz, jednak molekularna natura tego procesu nie została jeszcze poznana.

6. Zewnątrzkomórkowe DNA jako nośnik informacji

Zewnątrzkomórkowe DNA pełni bardzo ważną rolę w utrzymaniu prawidłowej struktury biofilmu, natomiast jego kluczową funkcją jest udział w rekombinacji genetycznej w procesie horyzontalnego transferu genów (HGT). Istnieje silna korelacja między wysokim stopniem zorganizowania biofilmu a częstością rekombinacji genetycznych [41]. Macierz biowarstwy zapewnia dogodne warunki ochronne przed niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi, zaś ściśle upakowanie komórek drobnoustrojów promuje sprawny mechanizm HGT [41, 45]. I tak np. stężenie eDNA w środowisku biofilmu *Enterococcus faecalis* było 1000-krotnie wyższe niż w otoczeniu tych bakterii w fazie wzrostu planktonicznego [2]. Pęcherzyki błonowe mogą być jednym ze sposobów transportu eDNA i przyczyniać się do zwiększenia genetycznej zmienności współwystępujących mikroorganizmów oraz wpływać korzystnie na ich przetrwanie [36, 50]. Zewnątrzkomórkowe DNA może być pochodzenia chromosomalnego, plazmidowego lub fagowego [36]. Pobrane eDNA może stanowić dla drobnoustrojów źródło substancji odżywczych (węgla, azotu, fosforu), zwłaszcza w okresie niskiej ich zasobności, lub zostać zintegrowane z genomem biorcy [62].

Bakterie znajdujące się wewnątrz biofilmu wykazują niską wrażliwość na działanie antybiotyków. Przyczyną tego jest zredukowany poziom metabolizmu komórkowego oraz obniżona zdolność penetracji gęstej struktury biowarstwy przez biocydy. Z tego powodu geny oporności na antybiotyki ulegają ekspresji najczęściej w powierzchniowych warstwach biofilmu. DNA dyfundujące w obrębie macierzy EPS przyczynia się do rozprzestrzenienia genów umożliwiających

przetrwanie w warunkach presji środowiskowej, panującej w danym mikrośrodkowisku [45]. Zdolność do transformacji poprzez eDNA i przenoszenie genów oporności na antybiotyki wykazano u różnych gatunków bakterii, a wśród nich *M. catarrhalis* [57], *H. influenzae* [25, 59], *N. gonorrhoeae* [12, 35], *Acinetobacter baylyi* [14], *A. baumannii* [56], *P. aeruginosa* [10] oraz *Campylobacter jejuni* [5].

6.1. Wpływ na wirulencję

Rozprzestrzenianie genów oporności w procesie HGT udowodniono również u *H. pylori*. Stwierdzono istnienie silnego związku między infekcją mieszaną *H. pylori* (zakażenie kilkoma szczepami bakterii) u pacjentów a opornością tych bakterii na antybiotyki [7, 16]. W doświadczeniu Cellini i wsp. [7] zademonstrowali, że szczepy z mieszanych infekcji wykazywały wyższy poziom oporności w porównaniu do szczepów z zakażeń pojedynczych: klarytromycyna (odpowiednio: 80% i 48%), moksifloksacylna (20 i 6%) oraz tynidazol (80% i 35%). Co więcej, szczepy wirulentne również częściej izolowano od osób z infekcją mieszaną. Fenotyp VacA s1m1/s1m2 zidentyfikowano u 70% pacjentów z infekcją wywołaną przez kilka szczepów *H. pylori* i 42% pacjentów z infekcją pojedynczym szczepem. Podobną korelację uzyskano dla karcynogennego białka CagA, wykrytego u 97% szczepów *H. pylori* izolowanych od pacjentów z zakażeniem mieszanym i u 85% szczepów z pojedynczych infekcji. W innym doświadczeniu Marzio i wsp. [43] sprawdzano kolonizację różnych regionów żołądka przez *H. pylori* u pacjentów dotychczas nie leczonych i po przebytej eradykacji. Połowa pacjentów z pierwotnym zakażeniem *H. pylori* i 2/3 pacjentów po leczeniu posiadała te drobnoustroje zarówno w regionie trzonu, jak i części przedodźwiernikowej żołądka. Oporność drobnoustrojów kolonizujących cały żołądek była wyższa niż u tych kolonizujących jedynie część przedodźwiernikową. Hodowla *in vitro* mieszaniny dwóch szczepów, jednego izolowanego od pacjenta z nowotworem żołądka i drugiego od pacjenta z chłoniakiem typu MALT, prowadziła do uzyskania 60% chimerycznych klonów o bardziej zjadliwej kombinacji alleli genów *vacA* i *cagA* [17]. Potwierdza to hipotezę o promocji HGT w populacjach mieszanych i możliwości generowania *H. pylori* o mozaikowym genotypie [17, 19, 33].

6.2. Transformacja

Jednym z kluczowych sposobów tworzenia zmienności mikroorganizmów jest transformacja. Proces ten umożliwia pobieranie zewnątrzkomórkowego DNA i użycie go w procesie rekombinacji genetycznej [38, 45, 53]. Kompetencja do transformacji może być procesem stałym lub indukowanym w warunkach *in*

vitro poprzez wystawienie na związki chemiczne lub przez elektroporację. Stała, naturalna kompetencja do transformacji wywołana jest obecnością eDNA w biofilmach. Zewnątrzkomórkowe DNA zapewnia bliski kontakt komórek i utrzymanie struktury biowarstwy, co może inicjować proces transformacji [41]. Określono, że liza 1 komórki bakterii może zwiększyć lokalne stężenie DNA do 100 µg/ml. Tak wysoka zawartość DNA w środowisku o dużym zagęszczeniu mikroorganizmów sprawia, że biofilmy są idealnym środowiskiem do zachodzenia procesu HGT [3]. Na przykładzie Gram-dodatnich paciorkowców *Streptococcus mutans* wykazano 10–600-krotny wzrost aktywności procesu naturalnej transformacji w biofilmie w porównaniu do form planktonicznych [39]. Pozyskiwanie korzystnych genów (warunkujących oporność, kodujących enzymy związane z katabolizmem, zwiększających właściwości adhezyjne) odbywa się poprzez zintegrowanie DNA z chromosomem mikroorganizmu [41].

6.3. Naturalna kompetencja *H. pylori*

Bakteria *H. pylori* jest drobnoustrojem naturalnie kompetentnym i zdolnym do pobierania eDNA z otaczającego środowiska [11, 28, 61]. Częstość transformacji jest zależna od szczepu biorcy oraz genów, które są pobierane przez mikroorganizm. Transformacja u *H. pylori* odbywa się za pośrednictwem 2-niciowego DNA i jest procesem 1000-krotnie skuteczniejszym (10^{-5} – 10^{-6}) niż przy użyciu 1-niciowego DNA. W komórkach *H. pylori* wykryto obecność bardzo wydajnego systemu transportu i rekombinacji z krótkimi fragmentami nici kwasu nukleinowego tj. 1300 pz. Dla porównania średnia wielkość przenoszonych fragmentów u innych bakterii wynosi odpowiednio *Streptococcus pneumoniae* 2000 pz, *Neisseria meningitidis* 5000 pz i *Bacillus subtilis* 10000 pz. Taka strategia umożliwia sprawne zachodzenie procesu transformacji i uzyskiwanie różnorodnych wariantów tzw. quasi-gatunków *H. pylori* [40].

Pobieranie DNA przez *H. pylori* odbywa się za pośrednictwem systemu podobnego do T4SS tj. systemu comB [11, 28, 29]. Jest on ortologiczny do systemu virB *Agrobacterium tumefaciens*. System comB występuje u wszystkich szczepów *H. pylori* i wpływa na ich naturalną kompetencję do poboru eDNA ze środowiska [29]. Dodatkowo u części szczepów może występować alternatywny system T4SS, zaangażowany w translokację karcynogennych białek CagA do komórek eukariotycznych [28, 29]. System poboru dsDNA u *H. pylori* jest dwuetapowy. Pierwszy etap warunkowany jest przez system comB i prowadzi do translokacji eDNA ze środowiska pozakomórkowego do przestrzeni peryplazmatycznej bakterii. Drugi etap determinowany jest przez kanał błonowy comEC, homologiczny do systemu *B. subtilis* i umożliwia transport nici DNA

przez błonę wewnętrzną do cytoplazmy. U mutantów *H. pylori* pozbawionych białek ComEC dochodziło do akumulowania DNA w przestrzeni peryplazmatycznej i braku efektywnej rekombinacji [61]. W doświadczeniu Yeh i wsp. [65] uzyskano mutanty genu kodującego białko HP1361 *H. pylori*, który jest homologiem ComE3 *B. subtilis*. Mutagenizaacja doprowadziła do znacznego spadku częstości transformacji *H. pylori* ($<10^{-9}$), natomiast była przywrócona przy komplementacji wektorem zawierającym HP1361. To ukazuje, że kanał ComEC jest kluczowy dla zachodzenia skutecznego procesu transformacji. Dorer i wsp. [11] infekowali myszy C57BL/6 specjalnie wyselekcjonowanym szczepem *H. pylori* MSD132, zdolnym do przeżycia w żołądku myszy co najmniej 28 tygodni. U mutantów $\Delta comB10$, niezdolnych do pobierania DNA ze środowiska, wykazano niższy potencjał kolonizacji żołądka myszy niż u szczepów dzikich w 8 tygodniu infekcji. Wskazuje to na istotność procesu naturalnej kompetencji jako źródła nukleotydów i energii podczas chronicznej infekcji. Dodatkowo, u mutantów $\Delta dprA$ (cytozolowego czynnika kompetencji, promującego rekombinację z pobraną DNA) również ukazano obniżony poziom kolonizacji żołądka. Obserwacja ta dowodzi z kolei o roli naturalnej kompetencji jako mechanizmu zwiększającego żywotność mikroorganizmów przez generowanie zmienności i adaptacji do niekorzystnych warunków panujących w środowisku żołądka.

Pęcherzyki błonowe zdolne są do przenoszenia eDNA, z tego też powodu postuluje się określenie systemu pęcherzykowego jako czwartego, alternatywnego dla koniugacji, transdukcji i transformacji, systemu rekombinacji genetycznej w procesie HGT. Mechanizm ten, w odróżnieniu od transformacji, miałby umożliwiać drobnoustrojom pobór DNA niezależnie od stanu ich kompetencji [64]. Naturalna, stała kompetencja do transformacji *H. pylori* wydaje się być niezasadna, ponieważ bakteria ta wydziela liczne OMV, zawierające eDNA, zdolne do indukowania rekombinacji. Z tego powodu sekrecja pęcherzyków błonowych powinna być wystarczająca do zapewnienia *H. pylori* zmienności genetycznej. Doświadczenie Fulsundar i wsp. [15] prowadzone na modelu *Acinetobacter baylyi* wyjaśniło zależność między produkcją OMV a transferem DNA, warunkowaną stałą kompetencją. Wydzielanie pęcherzyków zawierających plazmid oporności przez *A. baylyi* J26 indukowało syntezę β -laktamaz u szczepów wrażliwych. Co więcej, transfer DNA zachodził także w środowisku przy obecności DNaz (100 ng/ml). Natomiast komórki mutantów *A. baylyi* $\Delta comA$ i $\Delta comB-F$ nie uległy transformacji. Przeprowadzone badania Renelli i wsp. [55] potwierdzają wyniki poprzednich badaczy, ponieważ zawierające DNA OMV *P. aeruginosa* PAO1 nie generowały powstawania transformantów bakterii własnego szczepu lub *E. coli* DH5 α . Sugeruje to, że do

zajścia rekombinacji genetycznej wymagany był stan kompetencji bakterii-biorców.

Pobór eDNA ze środowiska wymaga sprawnego systemu, umożliwiającego transfer kwasu nukleinowego przez dwuwarstwą lipidową (błonę zewnętrzną i wewnętrzną) do cytozolu komórki mikroorganizmu. Przyjęcie eDNA niezależnie od mechanizmu, tj. na drodze transformacji czy endocytozy pęcherzyków błonowych, wymaga aktywnego aparatu pobierającego materiał genetyczny i stanu kompetencji drobnoustrojów. Stąd też prawdopodobnie stan stałej kompetencji *H. pylori* promuje przyswojenie eDNA zakotwiczonego na powierzchni pęcherzyków błonowych, co zależne jest od kanałów comB oraz comEC, które uczestniczą także w procesie transformacji.

7. Podsumowanie

H. pylori jest bakterią zdolną do przetrwania w śluzówce żołądka przez długi czas. Wydaje się, że przewlekłe bytowanie w organizmie gospodarza jest, między innymi, zależne od sekrecji pęcherzyków błonowych. OMV *H. pylori* posiadają małe rozmiary, co przyczynia się do ich skuteczniejszej adhezji i internalizacji z epitelium żołądka. Taki sposób dostarczania czynników wirulencji umożliwia uniknięcie bezpośredniego kontaktu z komórkami gospodarza oraz ochronę przed układem odpornościowym. Dodatkowo, wydzielanie pęcherzyków wzmacnia także zdolność do tworzenia agregatów komórek i biofilmu u tej bakterii. Bliski kontakt drobnoustrojów zaś stymuluje zachodzenie procesu horyzontalnego transferu genów za pośrednictwem eDNA, zakotwiczonego na powierzchni pęcherzyków błonowych. Z rozważań przedstawionych w niniejszej pracy wynika, że stan naturalnej kompetencji do transformacji i sekrecja OMV są najprawdopodobniej dwoma ściśle ze sobą związanymi procesami. Bez sprawnego aparatu determinującego pobór eDNA ze środowiska, niemożliwe jest przeprowadzenie przez mikroorganizm procesu rekombinacji z DNA, uzyskanym w wyniku endocytozy pęcherzyków błonowych. System pęcherzykowy powinien być więc pojmowany jako alternatywny, ale nie oddzielny od transformacji, mechanizm przyswajania kwasu nukleinowego ze środowiska. Z tego też powodu, naturalnie kompetentny *H. pylori* może przypuszczalnie w skuteczny sposób generować swoją zmienność i zwiększać możliwości przetrwania za pośrednictwem sekrecji eDNA poprzez OMV.

Piśmiennictwo

1. Anderson J.K., Huang J.Y., Wreden C., Sweeney E.G., Goers J., Remington S.J., Guillemin K.: Chemorepulsion from the quorum signal autoinducer-2 promotes *Helicobacter pylori* biofilm dispersal. *mBio*, 6, e00379–15 (2015)

2. Barnes A.M., Ballering K.S., Leibman R.S., Wells C.L., Dunny G.M.: *Enterococcus faecalis* produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. *MBio*, **3**, e00193–12 (2012)
3. Baur B., Hanselmann K., Schlimme W., Jenni B.: Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3673–3678 (1996)
4. Biernat M., Gościński G.: The pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection – the significance of selected virulence factors. *Forum zakaż.* **2**, 7–16 (2011)
5. Brown H.L., Hanman K., Reuter M., Betts R.P., van Vliet A.H.M.: *Campylobacter jejuni* biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment. *Front. Microbiol.* **6**, 699 (2015)
6. Bumann D., Aksu S., Wendland M., Janek K., Zimny-Arndt U., Sabarth N., Meyer T.F., Jungblut P.R.: Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **70**, 3396–3403 (2002)
7. Cellini L., Grande R., Di Campli E., Di Bartolomeo S., Capodicasa S., Marzio L.: Analysis of genetic variability, antimicrobial susceptibility and virulence markers in *Helicobacter pylori* identified in Central Italy. *Scand. J. Gastroenterol.* **41**, 280–287 (2006)
8. Cellini L., Grande R., Di Campli E., Di Bartolomeo S., Di Giulio M., Traini T., Trubiani O.: Characterization of an *Helicobacter pylori* environmental strain. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 761–769 (2008)
9. Chitcholtan K., Hampton M.B., Keenan J.I.: Outer membrane vesicles enhance the carcinogenic potential of *Helicobacter pylori*. *Carcinogenesis*, **29**, 2400–2405 (2008)
10. Ciofu O., Beveridge T.J., Kadurugamuwa J., Walther-Rasmussen J., Høiby N.: Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 9–13 (2000)
11. Dorer M.S., Cohen I.E., Sessler T.H., Fero J., Salama N.R.: Natural competence promotes *Helicobacter pylori* chronic infection. *Infect. Immun.* **81**, 209–215 (2013)
12. 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)
13. Flemming C.-H., Wingender J.: The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633 (2010)
14. Fulsundar S., Harms K., Flaten G.E., Johnsen P.J., Chopade B., Nielsen K.M.: Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 3469–3483 (2014)
15. Gloag E.S., Whitchurch C.B. i wsp.: Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 11541–11546 (2013)
16. Gościński G., Biernat M., Bińkowska A., Kus A., Iwańczak B.: Frequency of infection with *Helicobacter pylori* isolates of different antimicrobial profiles in children and adolescents. A preliminary study. *Adv. Clin. Exp. Med.* **26**, 263–268 (2017)
17. Grande R., Di Campli E., Di Bartolomeo S., Verginelli F., Di Giulio M., Baffoni M., Bessa L.J., Cellini L.: *Helicobacter pylori* biofilm: a protective environment for bacterial recombination. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 669–676 (2012)
18. Grande R., Di Giulio M., Bessa L.J., Di Campli E., Baffoni M., Guarnieri S., Cellini L.: Extracellular DNA in *Helicobacter pylori* biofilm: a backstairs rumour. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 490–498 (2011)
19. Grande R., Mincione G. i wsp.: *Helicobacter pylori* ATCC 43629/NCTC 11639 outer membrane vesicles (OMVs) from biofilm and planktonic phase associated with extracellular DNA (eDNA). *Front. Microbiol.* **6**, 1369 (2015)
20. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P.: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004)
21. Hall-Stoodley L., Stoodley P.: Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* **13**, 7–10 (2005)
22. Haurat M.F., Aduse-Opoku J., Rangarajan M., Dorobantu L., Gray M.R., Curtis M.A., Feldman M.F.: Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **286**, 1269–1276 (2011)
23. 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)
24. Ismail S., Hampton M.B., Keenan J.I.: *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **71**, 5670–5675 (2003)
25. Kahn M.E., Barany F., Smith H.O.: Transformasomes: specialized membranous structures that protect DNA during *Haemophilus transformation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6927–6931 (1983)
26. Kamaguchi A., Nakayama K., Ichiyama S., Nakamura R., Watanabe T., Ohta M., Baba H., Ohya T.: Effect of *Porphyromonas gingivalis* vesicles on coaggregation of *Staphylococcus aureus* to oral microorganisms. *Curr. Microbiol.* **47**, 485–491 (2003)
27. Kaparakis M., Ferrero R.L. i wsp.: Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cell Microbiol.* **12**, 372–385 (2010)
28. Karnholz A., Hoefler C., Odenbreit S., Fischer W., Hofreuter D., Haas R.: Functional and topological characterization of novel components of the *comB* DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **188**, 882–893 (2006)
29. Karnholz A., Hoefler C., Odenbreit S., Fischer W., Hofreuter D., Haas R.: Functional and topological characterization of novel components of the *comB* DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **188**, 882–893 (2006)
30. Kato S., Kowashi Y., Demuth D.R.: Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb. Pathog.* **32**, 1–13 (2002)
31. Keenan J., Day T., Neal S., Cook B., Perez-Perez G., Allardyce R., Bagshaw P.: A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**, 259–264 (2000)
32. Keenan J.I., Davis K.A., Beaugie C.R., McGovern J.J., Moran A.P.: Alterations in *Helicobacter pylori* outer membrane and outer membrane vesicle-associated lipopolysaccharides under iron-limiting growth conditions. *Innate Immun.* **14**, 279–290 (2008)
33. Kennemann L., Suerbaum S. i wsp.: *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 5033–5038 (2011)
34. Kesty N.C., Mason K.M., Reedy M., Miller S.E., Kuehn M.J.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J.* **23**, 4538–4549 (2004)
35. Kouzel N., Oldewurtel E.R., Maier B.: Gene transfer efficiency in gonococcal biofilms: role of biofilm age, architecture, and pilin antigenic variation. *J. Bacteriol.* **197**, 2422–2431 (2015)
36. Kuehn M.J., Kesty N.C.: Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* **19**, 2645–2655 (2005)
37. Kulkarni H.M., Jagannadham M.V.: Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology*, **160**, 2109–2121 (2014)
38. Kung S.H., Almeida R.P.: Biological and genetic factors regulating natural competence in a bacterial plant pathogen. *Microbiology*, **160**, 37–46 (2014)
39. Li Y.H., Lau P.C., Lee J.H., Ellen R.P., Cvitkovitch D.G.: Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J. Bacteriol.* **183**, 897–908 (2001)

40. Lin E.A., Zhang X.-S., Levine S.M., Gill S.R., Falush D., Blaser M.J.: Natural transformation of *Helicobacter pylori* involves the integration of short DNA fragments interrupted by gaps of variable size. *PLoS Pathog.* **5**, e1000337 (2009)
41. Madsen J.S., Burmølle M., Hansen L.H., Sørensen S.J.: The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 183–195 (2012)
42. Manning A.J., Kuehn M.J.: Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* **11**, 258 (2011)
43. Marzio L., Cellini L., Amitrano M., Grande R., Serio M., Cappello G., Grossi L.: *Helicobacter pylori* isolates from proximal and distal stomach of patients never treated and already treated show genetic variability and discordant antibiotic resistance. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 467–472 (2011)
44. Mashburn L.M., Whiteley M.: Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, **437**, 422–425 (2005)
45. Moradigaravand D., Engelstädter J.: The impact of natural transformation on adaptation in spatially structured bacterial populations. *BMC Evol. Biol.* **14**, 141 (2014)
46. Mullaney E., Brown P.A., Smith S.M., Botting C.H., Yamaoka Y.Y., Terres A.M., Kelleher D.P., Windle H.J.: Proteomic and functional characterization of the outer membrane vesicles from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics Clin. Appl.* **3**, 785–796 (2009)
47. O'Donoghue E.J., Krachler A.M.: Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell Microbiol.* **18**, 1508–1517 (2016)
48. Olofsson A., Arnqvist A. i wsp.: Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. *Mol. Microbiol.* **77**, 1539–1555 (2010)
49. Olofsson A., Nygård Skalman L., Obi I., Lundmark R., Arnqvist A.: Uptake of *Helicobacter pylori* vesicles is facilitated by clathrin-dependent and clathrin-independent endocytic pathways. *MBio*, **5**, e00979–14 (2014)
50. Olsen I., Amano A.: Outer membrane vesicles – offensive weapons or good Samaritans? *J. Oral. Microbiol.* DOI:10.3402/jom.v7.27468 (2015)
51. Palsdottir H., Remis J.P., Schaudinn C., O'Toole E., Lux R., Shi W., McDonald K.L., Costerton J.W., Auer M.: Three-dimensional macromolecular organization of cryofixed *Myxococcus xanthus* biofilms as revealed by electron microscopic tomography. *J. Bacteriol.* **191**, 2077–2082 (2009)
52. Parker H., Chitcholtan K., Hampton M.B., Keenan J.I.: Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **78**, 5054–5061 (2010)
53. Parker H., Keenan J.I.: Composition and function of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles. *Microbes Infect.* **14**, 9–16 (2012)
54. Perez Vidakovic M.L.A., Jendholm J., Mörgelin M., Månsson A., Larsson C., Cardell L.-O., Riesbeck K.: B cell activation by outer membrane vesicles—a novel virulence mechanism. *PLoS Pathog.* **6**, e1000724 (2010)
55. Renelli M., Matias V., Lo R.Y., Beveridge T.J.: DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, **150**, 2161–2169 (2004)
56. Rumbo C., Fernández-Moreira E., Merino M., Poza M., Mendez J.A., Soares N.C., Mosquera A., Chaves F., Bou G.: Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3084–3090 (2011)
57. Schaar V., Nordström T., Mörgelin M., Riesbeck K.: *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles carry β -Lactamase and promote survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by inactivating amoxicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3845–3853 (2011)
58. Schooling S.R., Beveridge T.J.: Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.* **188**, 5945–5957 (2006)
59. Sharpe S.W., Kuehn M.J., Mason K.M.: Elicitation of epithelial cell-derived immune effectors by outer membrane vesicles of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **79**, 4361–4369 (2011)
60. Smalyukh I.I., Butler J., ShROUT J.D., Parsek M.R., Wong G.C.: Elasticity-mediated nematiclike bacterial organization in model extracellular DNA matrix. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **78**, e030701 (2008)
61. Stingl K., Müller S., Scheidgen-Kleyboldt G., Clausen M., Maier B.: Composite system mediates two-step DNA uptake into *Helicobacter pylori*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 1184–1189 (2010)
62. Vorkapic D., Pressler K., Schild S.: Multifaceted roles of extracellular DNA in bacterial physiology. *Curr. Genet.* **62**, 71–79 (2016)
63. Winter J., Letley D., Rhead J., Atherton J., Robinson K.: *Helicobacter pylori* membrane vesicles stimulate innate pro- and anti-inflammatory responses and induce apoptosis in Jurkat T cells. *Infect. Immun.* **82**, 1372–1381 (2014)
64. 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)
65. Yeh Y.-C., Lin T.-L., Chang K.-C., Wang J.-T.: Characterization of a ComE3 homologue essential for DNA transformation in *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **71**, 5427–5431 (2003)
66. 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**, 197–210 (2009)
67. Yonezawa H., Osaki T., Woo T., Kurata S., Zaman C., Hojo F., Hanawa T., Kato S., Kamiya S.: Analysis of outer membrane vesicle protein involved in biofilm formation of *Helicobacter pylori*. *Anaerobe*, **17**, 388–390 (2011)