

Received: 03.08.2020  
Accepted: 23.10.2020  
Published: 28.12.2020

## Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako mediatory komunikacji międzykomórkowej

### Bacterial extracellular vesicles as cell-cell communication mediators

Anna Chudzik, Mariola Paściak

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, Wrocław

*Pamięci Prof. Haliny Mordarskiej, znakomitego mikrobiologa i wybitnego eksperta w zakresie biologii, klasyfikacji i diagnostyki mikrobiologicznej promieniowców*

#### Streszczenie:

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe tworzą heterogenną grupę nanocząstek, uwalnianych zarówno przez komórki prokariotyczne, jak i eukariotyczne, które pełnią zróżnicowane funkcje biologiczne i uczestniczą w komunikacji międzykomórkowej. Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zbudowane są z: lipidów, białek i kwasów nukleinowych. Istnieje wiele hipotez powstawania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, jednak ich mechanizmy biogenezy pozostają nadal niewyjaśnione. Wewnątrz pęcherzyków mogą być zawarte trudno rozpuszczalne metabolity lub cząsteczki sygnałowe, DNA oraz RNA. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pełnią funkcje ochronne, mogą eliminować inne komórki bakteryjne, biorą również udział w horyzontalnym transferze genów. Enzymy zawarte w pęcherzykach ułatwiają drobnoustrojom pozyskiwanie substancji odżywczych i zasiedlanie różnych nisz ekologicznych. Cząsteczki sygnałowe przenoszone w pęcherzykach umożliwiają tworzenie biofilmu. Drobnoustroje patogenne w wydzielanych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych przenoszą czynniki wirulencji, w tym toksyny, do komórek gospodarza. Poprzez pęcherzyki bakterie mogą też modulować odpowiedź odpornościową. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są obiecującymi kandydatami do projektowania szczepionek, mogą być także stosowane jako nośniki leków. W artykule omówiono obecny stan wiedzy dotyczący biogenezy, składu, metod otrzymywania, fizjologicznych funkcji oraz potencjalnych zastosowań pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki organizmów prokariotycznych.

#### Słowa kluczowe:

**pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, pęcherzyki błonowe, oddziaływania między komórkami bakterii, interakcje gospodarz-mikroorganizm, izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, biogeneza pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, lipidomika, proteomika, genomika**

#### Summary:

Extracellular vesicles constitute a heterogeneous group of nanoparticles, released by both prokaryotic and eukaryotic cells, which perform various biological functions and participate in cell-cell communication. Bacterial extracellular vesicles are made of lipids, proteins and nucleic acids. There are a number of hypotheses for the formation of extracellular vesicles, but the mechanisms of biogenesis of these structures remain unclear. Hardly soluble metabolites or signaling molecules, DNA and RNA are vesicles cargo. Extracellular vesicles have a protective function, they can eliminate other bacterial cells and participate in horizontal gene transfer. The enzymes contained inside the vesicles facilitate the acquisition of nutrients and help colonize various ecological niches. Signal molecules carried in the vesicles enable biofilm formation. In the secreted extracellular vesicles pathogenic microorganisms carry virulence factors, including toxins, into the host cells. Via vesicles, bacteria can also modulate the host immune system. Bacterial extracellular vesicles are promising vaccine candidates and can be used as drug carriers. The review discusses the current knowledge concerning biogenesis, composition, preparation methods, physiological functions and potential applications of extracellular vesicles secreted by prokaryotic cells.

**Keywords:****extracellular vesicles, membrane vesicles, interactions between bacteria, host-microbe interactions, isolation of extracellular vesicles, biogenesis of extracellular vesicles, lipidomics, proteomics, genomics****GICID**

01.3001.0014.6165

**DOI:**

10.5604/01.3001.0014.6165

**Word count:**

10 517

**Tables:**

1

**Figures:**

3

**References:**

117

**Adres autorki:**

dr hab. Mariola Paściak, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław; e - mail: mariola.pasciak@hirszfeld.pl

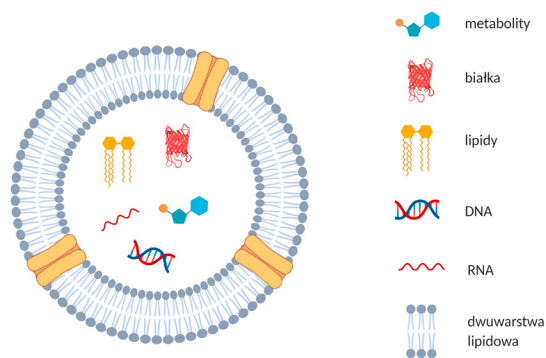
**Wykaz skrótów:**

**AFM** – mikroskopia sił atomowych (Atomic Force Microscopy), **BCA** – test kwasu bicinechinowego (Bicinchoninic Acid Assay), **BMV** – bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (Bacterial Membrane Vesicles), **Cryo-EM** – mikroskopia krioelektronowa (Cryogenic Electron Microscopy), **ELISA** – test immunoenzymatyczny (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), **ESI-MS** – spektrometria mas z jonizacją typu elektrosprej (Electrospray Ionization Mass Spectrometry), **EVs** – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (Extracellular Vesicles), **HPLC** – wysokosprawna chromatografia cieczowa (High-Performance Liquid Chromatography), **LPS** – lipopolisacharyd (Lipopolysaccharide), **MALDI-TOF MS** – spektrometria mas z wykorzystaniem jonizacji próbki poprzez desorpcję laserem z matrycy z detekcją czasu przelotu jonów (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation – Time of Flight Mass Spectrometry), **MVs** – pęcherzyki błonowe (Membrane Vesicles), **NGS** – sekwencjonowanie następnej generacji (Next-Generation Sequencing), **OMVs** – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (Outer Membrane Vesicles), **OIMVs** – pęcherzyki błony zewnętrznej i wewnętrznej (Outer-Inner Membrane Vesicles), **Real-time PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time Polymerase Chain Reaction), **SDS PAGE** – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących w obecności SDS (Polyacrylamide Gel Electrophoresis), **SEM** – skaningowa mikroskopia elektronowa (Scanning Electron Microscopy), **TEM** – transmisyjna mikroskopia elektronowa (Transmission Electron Microscopy), **TLC** – chromatografia cienkowarstwowa – (Thin Layer Chromatography), **UHPLC** – ultra-wysokosprawna chromatografia cieczowa (Ultra High-Performance Liquid Chromatography).

**WSTĘP**

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs – Extracellular Vesicles) tworzą heterogenną grupę nanocząstek, uwalnianych zarówno przez komórki prokariotyczne, jak i eukariotyczne, pełniących zróżnicowane funkcje biologiczne. Pęcherzyki te mają kształt kulisty, natomiast ich średnica wynosi 30–5000 nm [107]. Pęcherzyki otoczone są dwuwarstwą lipidową, która może zawierać elementy strukturalne właściwe dla błon komórek stanowiących źródło ich pochodzenia, w przypadku bakteryjnych EV: błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych (fosfolipidy, białka błonowe, lipopolisacharyd), czy błony komórkowej bakterii Gram-dodatnich. Oprócz lipidów i białek, we wnętrzu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych mogą się też znajdować kwasy nukleinowe lub metabolity (ryc. 1).

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą być klasyfikowane w zależności od różnych cech, takich jak: wymiary, pełnione funkcje, mechanizm biosyntezy, rodzaj komórek, z których są uwalniane czy ładunku, który przenoszą. Wśród eukariotycznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wyróżnić można trzy grupy pęcherzyków: egzozomy, mikropęcherzyki oraz ciała apoptotyczne [31]. Egzozomy

**Ryc. 1.** Budowa bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

powstają wewnątrzkomórkowo w procesie endocytozy, tworząc tzw. ciała wielopęcherzykowe (MVBs – Multivesicular Bodies), które następnie są uwalniane z komórki w procesie egzocytozy. Mikropęcherzyki mają większą średnicę od egzozomów i są uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej przez pączkowanie, czyli tworzenie się wypukleń błony komórkowej. Ciała apoptotyczne, będące rozmiarowo

największymi spośród pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, powstają w wyniku apoptozy komórki i zawierają pozostałości składników komórek, np. cytozolu, zdegradowanych białek, fragmentów DNA oraz organelli komórkowych.

U organizmów prokariotycznych występują jedynie mikro-pęcherzyki, o średnicach 20–250 nm [15], jednak istnieje kilka typów tych struktur. Najbardziej znanymi są pęcherzyki powstające przez uwypuklenie błony zewnętrznej tzw. OMV (OMV – Outer Membrane Vesicles). U bakterii Gram-ujemnych, oprócz OMV, występują także pęcherzyki otoczone dwuwarstwową błoną zawierające zarówno błonę zewnętrzną, jak i cytoplazmatyczną tzw. „pęcherzyki błony zewnętrznej i wewnętrznej” (OIMV – Outer-Inner Membrane Vesicles). Pęcherzyki błonowe bakterii Gram-dodatnich mają inny skład niż bakterii Gram-ujemnych. Ponadto bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą być związane z długimi włóknistymi strukturami łączącymi komórki, znanymi jako nanopydy i nanorurki, określane jako struktury TSMS (tube-shaped membranous structures). Struktury te występują na powierzchni komórek zarówno bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich, tworzą połączenia między komórkami, które umożliwiają wymianę różnych składników komórkowych i ułatwiają komunikację między komórkami [109].

Zdolność do wytwarzania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest charakterystyczna dla wszystkich przedstawicieli świata żywego: bakterii, archeonów i komórek eukariotycznych. Skoro jest „ewolucyjnie konserwowana” musi być ważna zarówno dla pojedynczych komórek, jak i w oddziaływaniach między różnymi komórkami.

Należy podkreślić, że w opisach dotyczących badań nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi, występują nieśpójności w nazewnictwie, które mogą wprowadzać chaos i utrudniać dokładne poznanie problemu. Określenie „pęcherzyki zewnątrzkomórkowe” jest bardzo szerokie i dotyczyć może zarówno pęcherzyków uwalnianych przez organizmy prokariotyczne, jak i eukariotyczne. Ze względu na budowę i fizjologię komórek bakteryjnych źródłem pochodzenia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, inaczej mikropęcherzyków (MV – Microvesicles), są błony komórkowe. Używane są rozróżnienia mikropęcherzyków – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (OMV – Outer Membrane Vesicles) w przypadku bakterii Gram-ujemnych, wytwarzających pęcherzyki z błony zewnętrznej lub wspomniane już pęcherzyki błony zewnętrznej i wewnętrznej OIMV, natomiast pęcherzyki wytwarzane przez bakterie Gram-dodatnie nazywa się pęcherzykami błonowymi (MV – Membrane Vesicles) lub cytoplazmatycznymi (CMV – Cytoplasmic Membrane Vesicles). Poza tym stosowane są nazwy: BMV (Bacterial Membrane Vesicles) dla odróżnienia od OMV lub inne.

W dalszej części pracy omówiono: historię odkrycia, biogenezy, skład, metody otrzymywania, funkcje oraz przykładowe zastosowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki organizmów prokariotycznych.

## HISTORIA ODKRYCIA BAKTERYJNYCH PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Pierwsze doniesienia o bakteryjnych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych sięgają lat sześćdziesiątych ubiegłego stulecia, kiedy to po raz pierwszy zaobserwowano niewielkie, sferyczne cząstki otaczające komórki *Escherichia coli*, z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego [54]. W 1966 r. w wyniku ekstrakcji w układzie fenol-woda wyizolowano pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzące od *Veillonella parvula*, które charakteryzowały się zróżnicowaną wielkością i miały podobną budowę do błony zewnętrznej *V. parvula* [73]. Zaobserwowano również uwalnianie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w fazie logarytmicznego wzrostu *Vibrio cholerae* sugerując, że przyczyną ich wydzielania jest eksport toksyn bakteryjnych do środowiska zewnątrzkomórkowego [16]. Badania wykazały, że w świetle pęcherzyków wytwarzanych przez bakterie Gram-ujemne obecne są białka, lipidy i lipopolisacharydy wywodzące się z macierzystych komórek bakteryjnych. Inne badania wykazały wzmożone uwalnianie pęcherzyków w wyniku stresu komórkowego [96].

Długo uważano, że bakterie Gram-dodatnie ze względu na grubą warstwę peptydoglikanu i brak błony zewnętrznej nie wytwarzają pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Pierwsza praca dokumentująca istnienie pęcherzyków u *Staphylococcus aureus* powstała w 1990 r., natomiast opisanie ich składu białkowego nastąpiło w 2009 r. [62]. Od tego czasu, badania prowadzone nad innymi przedstawicielami bakterii Gram-dodatnich, wykazały istnienie pęcherzyków u wielu gatunków, m.in. *Bacillus subtilis*, *B. anthracis* [92], *Streptomyces coelicolor* [100] *Clostridium perfringens* [44] i *Streptococcus pneumoniae* [76].

Obecnie wraz z rozwojem metod analitycznych oraz technik biologii molekularnej i mikroskopii elektronowej, wykazano obecność pęcherzyków zewnątrzkomórkowych u wielu gatunków bakterii. Ich znaczenie w funkcjonowaniu mikroorganizmów w różnych warunkach wzbudza ogromne zainteresowanie, szczególnie ich możliwych aplikacji klinicznych.

## BIOGENEZA BAKTERYJNYCH PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe różnią się strukturą i składem, a niektóre z tych różnic można wyjaśnić różnymi mechanizmami biogenezy.

### Bakterie Gram-ujemne

Uważa się, że drobnoustroje Gram-ujemne uwalniają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe w wyniku pęczkowania z otaczającej ich komórki błony zewnętrznej. Już w pierwszych badaniach wykazano, że zawartość lipidów, profil białkowy, a także swoista aktywność niektórych enzymów w pęcherzykach błonowych pochodzących z *E. coli* jest zbliżona do tych, które znajdują się w błonie zewnętrznej tych bakterii. W pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wykryto

mniejszą liczbę białek, w tym lipoprotein, niż w zewnętrznej błonie komórkowej, co pozwoliło wnioskować, że pęcherzyki te mogą pochodzić z jej specyficznego regionu [39]. Białko OmpA (OmpA – Outer membrane protein A) jest transbłonowym białkiem wchodzącym w skład błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych, N-koniec tego białka znajduje się na zewnątrz komórki, podczas gdy C-koniec łączy się z peptydoglikanem. Uważa się, że OmpA jest zakotwiczone w peptydoglikanie poprzez niekowalencyjne oddziaływanie z kwasem diaminopimelinowym, który sieciuje dwa sąsiednie peptydy z peptydoglikanem bakterii Gram-ujemnych [81, 103]. Wykazano, że brak białka OmpA prowadzi do nasilania uwalniania pęcherzyków zewnątrzłonowych u różnych gatunków drobnoustrojów. Na podstawie tych obserwacji zaproponowano schemat biogenezy pęcherzyków, który zakłada, że w wyniku deficytu niektórych białek związanych z osłoną komórkową, takich jak lipoproteiny czy OmpA, w określonym miejscu w błonie zewnętrznej dochodzi do osłabienia wiązania pomiędzy peptydoglikanem a błoną zewnętrzną. W efekcie, w błonie zewnętrznej powstaje uwypuklenie i w konsekwencji dochodzi do wytworzenia pęcherzyka zewnątrzkomórkowego [75]. Obecnie uwzględnia się kilka prawdopodobnych mechanizmów biogenezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Pierwszy z nich zakłada zerwanie bądź przegrupowanie kowalencyjnych wiązań pomiędzy molekułami błony zewnętrznej, a leżącą poniżej warstwą peptydoglikanu, co powoduje uwypuklenie błony zewnętrznej i generowanie pęcherzyka [56, 58]. Według innej hipotezy, akumulacja fragmentów peptydoglikanu oraz nieprawidłowości w połażowaniu białek, przyczyniają się do generowania wyższego ciśnienia w przestrzeni peryplazmatycznej, co powoduje powstanie wybrzuszenia w błonie zewnętrznej [38]. Odmiennej model biogenezy pęcherzyków bakterii Gram-ujemnych zakłada represję lub wyciszenie genów *VacJ*/*Yrb* związanych z transportem i gromadzeniem fosfolipidów w zewnętrznej warstwie błony zewnątrzkomórkowej. Dochodzi do jej asymetrycznego rozszerzenia, a następnie uwypuklenia i powstania pęcherzyka zewnątrzłonowego [2, 95]. U bakterii zawierających wić komórkową osłoniętą błoną zewnętrzną, np. *Alivibrio fischerii* istnieje mechanizm wytwarzania pęcherzyków w wyniku rotacji wici [109].

W 2013 r. po raz pierwszy wykazano, że wyizolowane z Antarktyki bakterie *Shewanella vesiculosa*, wytwarzają dwa rodzaje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych: tradycyjne OMV i pęcherzyki zbudowane z podwójnej błony lipidowej: zawierające zarówno błonę zewnętrzną, jak i cytoplazmatyczną, nazwane OIMV [82]. Autorzy oszacowali, że OIMV stanowią jedynie 0,1% wydzielanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W późniejszych badaniach OIMV wykryto też u innych bakterii Gram-ujemnych, u *Pseudoalteromonas marina* i te nanostruktury stanowiły prawie połowę wykrywanych pęcherzyków [109]. Niewiele wiadomo o mechanizmach biogenezy tych struktur, zwłaszcza w odniesieniu do różnic między nimi a klasycznymi OMV. Niedawne badania wykazały, że komórki *Stenotrophomonas maltophilia*

wytwarzały zarówno OMV, jak i OIMV po traktowaniu cyprofloksacyną [25, 109]. W rzeczywistości możliwe jest, że wszystkie bakterie Gram-ujemne oprócz OMV wytwarzają również OIMV i że te nanostruktury zostały niedostatecznie zbadane z powodów metodologicznych.

Jedną z możliwości powstawania pęcherzyków OIMV może być eksplodująca (wybuchowa) liza komórek spowodowana działaniem endolizyn. Bakteriofagi kodują endolizyny, które degradują peptydoglikan ściany komórkowej i przez to ułatwiają rozprzestrzenianie się fagów potomnych. Profagi wbudowują się w bakteryjny genom i w odpowiednich warunkach przechodzą ze stanu lizogenego w stan lityczny. Stres komórkowy spowodowany ekspozycją na czynniki uszkadzające DNA, np. promieniowanie ultrafioletowe, wyzwala odpowiedź SOS powodującą aktywację profaga prowadzącą do degradacji bakteryjnego DNA, uszkodzenia peptydoglikanu, a w konsekwencji do lizy komórki. U *P. aeruginosa* uszkodzenie DNA wywołuje ekspresję endolizyn powodującą zniszczenie warstwy peptydoglikanu, komórki stają się kuliste i eksplodują. Pozostałe fragmenty błon samoorganizują się w postaci pęcherzyków, które mogą też zawierać DNA i białka cytoplazmatyczne [109].

### Bakterie Gram-dodatnie

W związku z grubą warstwą peptydoglikanu budującą ścianę komórkową bakterii Gram-dodatnich mechanizm powstawania mikro-pęcherzyków pozostaje ciągle niewyjaśniony. Dotychczas zaproponowano trzy hipotezy biogenezy. Pierwsza z nich zakłada, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są „przeciskane” przez ścianę komórkową z wykorzystaniem ciśnienia turgorowego po uwolnieniu z błony plazmatycznej. Zarówno wielkość porów, jak i grubość ściany komórkowej mają wpływ na regulację rozmiaru pęcherzyków i ich zdolność do przechodzenia przez ścianę komórkową [114]. Kolejna hipoteza oparta jest na działaniu enzymów, które uwolnione z pęcherzyków, mogą wpływać na modyfikację ściany komórkowej, powodując jej „poluzowanie” i zwiększając w ten sposób rozmiar porów, ułatwiają przejście kolejnych pęcherzyków. Wykazano, że pęcherzyki błonowe zawierały enzymy zdolne do modyfikacji ściany komórkowej, co jest argumentem wspierającym tę hipotezę [62].

Enzymatyczna aktywność endolizyn u *Bacillus subtilis* nie powoduje eksplodującej lizy komórek, tylko wytwarza szczeliny w peptydoglikanie, przez które mogą się przeciskać pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Mechanizm ten może prowadzić do śmierci komórki z powodu utraty integralności błony komórkowej i jest nazywany „bubbling cell death” [109].

Istnieje także możliwość, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydostają się do środowiska pozakomórkowego za pomocą białek cytoszkieletu oraz kanałów transbłonowych. Hipoteza jest oparta na wynikach badań proteomicznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez

grzyby, które zawierały tubulinę i/lub aktyne jako strukturalne składowe kanałów transbłonowych [14, 114].

### *Mycobacterium*

Chociaż prątki należą do bakterii Gram-dodatnich, to wyróżniają się charakterystyczną tylko dla mykobakterii złożoną budową osłon komórkowych. Ściana komórkowa składa się z peptydoglikanu związanego kowalencyjnie z arabinogalaktanem oraz kwasami mikołowymi i interkalującymi wolnymi lipidami, które tworzą dwuwarstwą lipidową nazywaną egzomembraną prątkową lub mykomembraną [21]. Ścianę komórkową otacza kapsuła złożona z polisacharydów, białek oraz lipidów. Ze względu na swoistą budowę, wyjaśnienie mechanizmu uwalniania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez mykobakterie, podobnie jak w przypadku bakterii Gram-dodatnich, stanowi duże wyzwanie. *Mycobacterium tuberculosis* hodowane w warunkach niedoboru żelaza obficie wytwarzają pęcherzyki błonowe, co może wskazywać, że ich biogeneza jest regulowana przez dostępność/podaż żelaza. Prątki hodowane w warunkach obniżonej podaży żelaza wytwarzają duże ilości lipidowego sideroforu, czyli mykobaktyny, która gromadzi się na powierzchni komórki [87, 89, 94]. Interakcje mykobaktyny z błoną komórkową mogą bezpośrednio lub pośrednio stymulować biogenezę pęcherzyków. Wykazano, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe uwolnione w warunkach niedoboru żelaza zawierały mykobaktynę, co było poparciem tej hipotezy [84].

### **METODY IZOLACJI I TECHNIKI ANALITYCZNE STOSOWANE W ANALIZIE BAKTERYJNYCH PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH**

Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe można wyizolować z płynnego medium hodowlanego. W tym celu najczęściej stosuje się ultrawirowanie, które umożliwia rozdział mieszaniny w zależności od wielkości i gęstości składowych poprzez działanie siły odśrodkowej. Pierwszym etapem izolacji jest zwykle wirowanie z prędkością 4000–6000 x g, mające na celu usunięcie większych zanieczyszczeń, takich jak komórki bakteryjne czy pozostałości martwych komórek. Następnie pozyskany w wyniku wirowania supernatant, poddaje się sączeniu przez sączki o wielkości porów 0,22 µm i ponownie wiruje z prędkością 150000 x g. Uzyskaną frakcję pęcherzyków zewnątrzkomórkowych można dodatkowo oczyścić za pomocą ultrawirowania w gradiencie gęstości [30, 36, 53, 65]. Poza ultrawirowaniem, także ultrafiltracja może stanowić istotne narzędzie wspomagające pozyskanie i oczyszczanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Jest to technika, której siłę napędową stanowi wysokie ciśnienie roztworu rozdzielanego. Proces filtracji przebiega z użyciem sit molekularnych oraz membran zawierających pory o średnicy zbliżonej do średnic pojedynczych cząstek. Ekstrakcja pęcherzyków z zastosowaniem tej metody jest możliwa w połączeniu z ultrawirowaniem [65, 104] (ryc. 2). Dodatkowymi metodami izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, wymagającymi jednoczesnego stosowania wymienionych wyżej technik jest metoda oparta na

**Tabela 1.** Metody analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych [65]

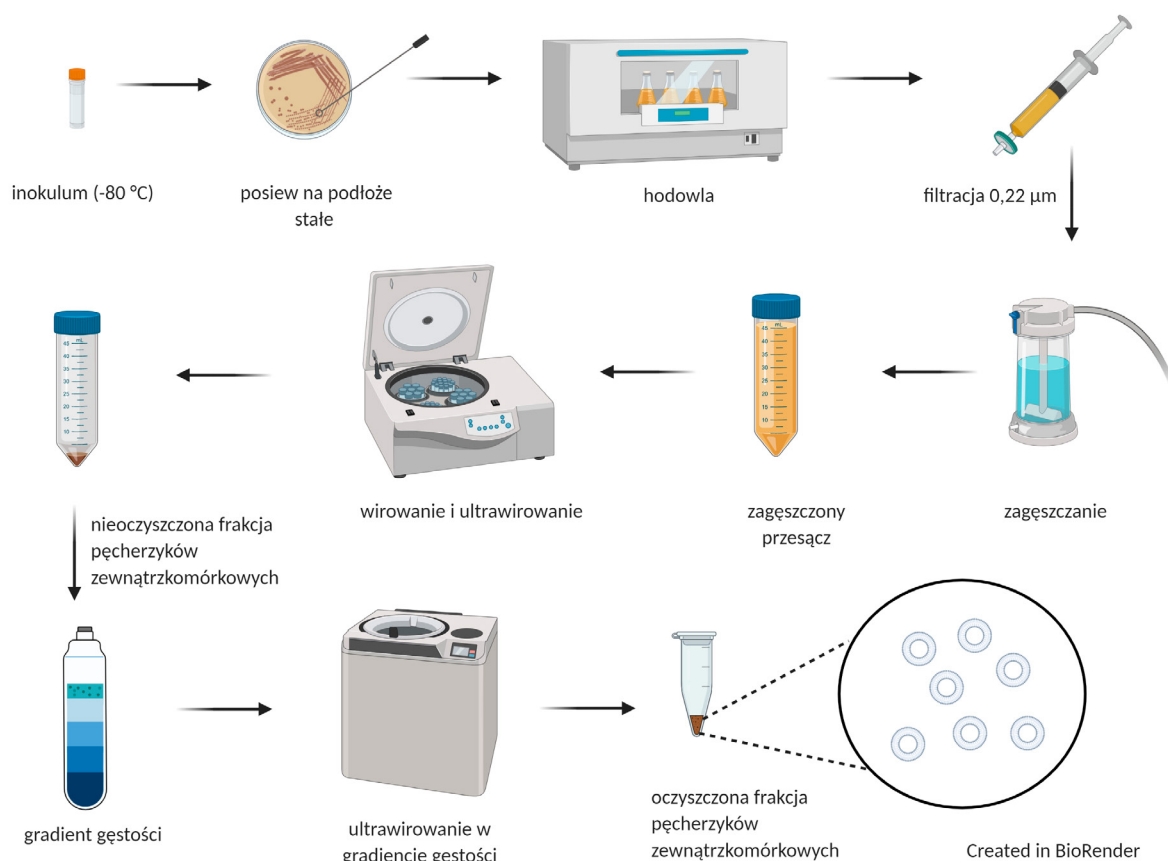
Metoda analizy			
Mikroskopia	Lipidomika	Proteomika	Genomika
TEM	TLC / HPLC / UHPLC	Test BCA	NGS
SEM	MALDI-TOF MS	SDS/PAGE	Real-time PCR
Cryo-EM	ESI-MS	Western blotting	elektroforeza kapilarna
AFM		ELISA	
		Metody kolorymetryczne	

precypitacji białek za pomocą 71 lub 75% siarczanu amonu [65]. W celu wyodrębnienia określonych cząsteczek zawartych w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych możliwe jest także wykorzystanie chromatografii powinowactwa (np. oddziaływania antygen-przeciwciała) [7]. Przegląd różnych metod stosowanych do analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zebrano w tabeli 1.

### **SKŁAD PĘCHERZYKÓW**

#### **Lipidy**

Charakterystyczną cechą niektórych lipidów np. glikofosfolipidów jest zdolność do tworzenia w środowisku wodnym uporządkowanych struktur – miceli lub dwuwarstwowych pęcherzyków. Lipidy bakteryjne mają wspólny szkielet zbudowany najczęściej z glicerolu, rzadziej ze sfingozyny, związki modyfikujące szkielet (cholina, etanoloamina lub cukry) oraz kwasy tłuszczowe. Kwasy tłuszczowe mogą być nasycone lub nienasycone, rozgałęzione lub o prostym łańcuchu albo zawierać grupy cyklopropanowe. Analiza lipidów pozwala na pozyskanie fundamentalnych informacji na temat struktury i biochemicznych właściwości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Za pomocą technik analitycznych, takich jak spektrometria mas czy chromatografia można wykrywać obecność ugrupowań polarnych w strukturze lipidu, wiązań podwójnych i długości łańcuchów kwasów tłuszczowych. Najczęściej występującym w bakteryjnych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych typem lipidów są fosfoglicerolipidy oraz glicerolipidy. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe bakterii Gram-ujemnych zawierają duże ilości lipopolisacharydów. Jak już wspomniano, skład lipidowy pęcherzyków *E. coli* oraz stosunek fosfolipidy/białka był bardzo zbliżony do składu błony zewnętrznej *E. coli*. Jednak, stosunek nienasyconych kwasów tłuszczowych do cyklopropanowych kwasów tłuszczowych był znacznie wyższy w OMV *E. coli*, niż w błonie zewnętrznej. Ze względu na to, że nienasycone kwasy tłuszczowe zastępowane są cyklopropanowymi gdy komórki wchodzi w fazę stacjonarną, autorzy sugerują, że badane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zostały uwolnione z komórek w fazie wykładniczego wzrostu [39, 75]. W biogenezie pęcherzyków duże znaczenie mają struktury ugrupowań



**Ryc. 2.** Izolacja i oczyszczanie bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

kwasów tłuszczowych, przede wszystkim ze względu na ich wpływ na sztywność i płynność błony lipidowej. Oprócz kwasów tłuszczowych istotne są również lipidy polarne, które biorą udział w ustaleniu konformacji błony. Fosfatydyloetanolamina (PE) jest typowym lipidem o kształcie stożka, który może powodować zakrzywianie błony przez skupianie się lub sekwestrację [1]. W badaniach pęcherzyków zewnątrzkomórkowych *Haemophilus influenzae* porównywano właściwości szczepu dzikiego z mutantem wykazującym zwiększone wydzielanie pęcherzyków w wyniku mutacji transportera fosfoglicerolipidów. Wykazano, że zawartość PE w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych mutantu była dwukrotnie wyższa niż w przypadku szczepu dzikiego [95]. Różnice w zawartości PE między pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi a błoną zewnętrzną opisano również u *Pseudomonas aeruginosa* [105]. Lokalne i asymetryczne gromadzenie lub wyczerpywanie PE w warstwie błony może powodować zmiany strukturalne błon lipidowych, które ostatecznie mogą prowadzić do uwypuklenia błony zewnętrznej komórki bakteryjnej, a w następstwie do uwolnienia pęcherzyków [75]. Stosunkowo niewiele badań składu lipidowego wykonano dla mikropęcherzyków bakterii Gram-dodatnich. W pęcherzykach zewnątrzkomórkowych *Streptococcus pyogenes* wykryto różnice w zawartości i składzie kwasów tłuszczowych specyficznych lipidów w porównaniu do błony komórkowej bakterii [91]. Stwierdzono, że pęcherzyki były wzbogacone

w fosfatydyloglicerol (PG) i uboższe w kardiolinę (CL), fosfolipid powodujący zakrzywienie błony. Wyniki te wskazują na istnienie uporządkowanego mechanizmu odpowiedzialnego za biogenezę pęcherzyków bakterii Gram-dodatnich. W 2018 r. wykonano analizę lipidomiczną pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i komórek *Propionibacterium acnes* (obecnie *Cutibacterium acnes*) za pomocą tandemowej spektrometrii mas [43]. Zidentyfikowano 214 różnych lipidów, z tego 187 lipidów było wspólnych dla komórek i pęcherzyków. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe *P. acnes* zawierały więcej fosfatydylocholin (PC), diacylogliceroli (DG), kwasów fosfatydowych (PA), fosfatydyloetanolamin (PE), kwasów lizofosfatydowych (LPA), lizofosfatydylocholin (LPC) oraz monoacylogliceroli (MG), niż komórki *P. acnes*. Cechą znaną pęcherzyków pochodzących od *P. acnes* jest znacząco zredukowana liczba triacylogliceroli (TG) w porównaniu do komórek. Wyniki te sugerują, że biochemiczne i fizyczne właściwości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych *P. acnes*, mogą się znacznie różnić od właściwości błony komórkowej tych bakterii [43].

W pęcherzykach wydzielanych przez aktynobakterie zawierające kwasy mikołowe, m.in. *M. tuberculosis* czy *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) wykryto znaczne ilości lipoprotein, w tym ligandy TLR2. Ponadto lipidy, które uległy ekstrakcji z pęcherzyków szczepów *M. bovis* BCG stanowiły głównie lipidy polarne, takie jak PE czy

fosfatydyloinozytolodimannozydy (Ac2PIM2), nie wykryto natomiast estrów kwasów mikolowych. Mając na uwadze to, że estry kwasów mikolowych zakotwiczone są przede wszystkim w zewnętrznej błonie mykobakterii, podejrzewa się, że badane pęcherzyki prątków pochodziły z błony wewnętrznej [83]. W warunkach ograniczonej podaży żelaza acylowane glicerydy oraz PE występowały w większej ilości, natomiast w warunkach optymalnej podaży żelaza znajdowano głównie acylowane glicerydy, stanowiące ważny komponent ściany komórkowej *Mycobacterium* [75, 83, 84, 93].

## Białka

Bakterie Gram-ujemne uwalniają pęcherzyki zewnątrz-błonowe, w których licznie występują białka pochodzące z cytoplazmy, błony wewnętrznej, peryplazmy i błony zewnętrznej. Analizy ilościowe wykazały, że w pęcherzykach zewnątrz-błonowych wydzielanych przez *E. coli* znajdowało się 0,2-0,5% białek błony zewnętrznej oraz przestrzeni peryplazmatycznej [13, 39, 49, 74]. Analizy proteomiczne wskazują na obecność w świetle pęcherzyków elementów pochodzących z komórek bakteryjnych, takich jak agregaty białkowe. Zgodnie z modelem biogenezy, w którym pęcherzyki powstają przez uwypuklenie błony zewnętrznej, białka cytoplazmatyczne nie powinny się znajdować w pęcherzykach OMV. Często jednak znaczne liczby białek cytoplazmatycznych były wykrywane nawet w starannie oczyszczonych frakcjach pęcherzyków zewnątrzkomórkowych [11, 57, 77]. Kadurugamuwa i Beveridge zasugerowali, że zlokalizowane i przejściowe pęknięcia peptydoglikanu, katalizowane przez autolizynę prowadzą do powstania pęcherzyków zewnątrz-błonowych zawierających struktury białkowe charakterystyczne dla cytoplazmy, a także zewnętrznej oraz wewnętrznej błony komórek *P. aeruginosa* [20, 45]. Eksplodująca liza komórek wyzwolana przez fagowe endolizyny powoduje powstanie OIMV i może wyjaśnić obecność białek cytoplazmatycznych u bakterii Gram-ujemnych. Natomiast pęcherzyki zewnątrzkomórkowe bakterii Gram-dodatnich zawierają białka cytoplazmatyczne, niekiedy są nawet nazywane cytoplazmatycznymi pęcherzykami błonowymi.

Analiza proteomu pęcherzyków błonowych wydzielanych przez *Brucella abortus* 2308 oraz RB51, wykonana z zastosowaniem SDS-PAGE w połączeniu z chromatografią cieczą, umożliwiła zidentyfikowanie białek, takich jak: SodC, Omp2b, Omp2a, Omp10, Omp16 i Omp19, które są czynnikami wirulencji *Brucella*. W przypadku szczepu *B. abortus* 2308 pęcherzyki błonowe zostały wzbogacone białkami biorącymi udział w przetwarzaniu informacji o środowisku, metabolizmie węglowodanów i aminokwasów oraz biorącymi udział w procesach genetycznych. Natomiast pęcherzyki szczepu *B. abortus* RB51 zawierały białka zaangażowane w metabolizm lipidów, cykl komórkowy i przetwarzanie informacji genetycznej [9]. Analiza proteomiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych *P. acnes* wykazała obecność białek zaangażowanych w procesy biochemiczne, oporność na antybiotyki, konkurencję bakterijną, przyleganie komórek, zjadliwość i immunogenność [43]. Białka zawarte w pęcherzykach bakteryjnych pełnią

róznicowane funkcje. Wiele z nich to czynniki wirulencji, które odgrywają rolę w inwazji, adhezji, oporności na antybiotyki, uszkodzeniu komórek gospodarza, tworzeniu biofilmu i promocji zjadliwości. Bakterie chorobotwórcze mogą umieszczać toksyny wewnątrz pęcherzyków i w ten sposób dostarczać je do komórek gospodarza, np. toksyna Shiga (*Shigella dysenteriae*), toksyna cholery (*V. cholerae*). Inne białka mogą uczestniczyć w kooperacji międzygatunkowej oraz komunikacji międzykomórkowej [13].

## Kwasy nukleinowe

Kwasy nukleinowe mogą się znajdować we wnętrzu lub na powierzchni pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez drobnoustroje. U bakterii Gram-ujemnych większość wykrywanego DNA znajdowano na zewnętrznych powierzchniach OMV [12]. Wykazano, że DNA zawarte w OMV jest pochodzenia chromosomalnego i mogą to być geny kodujące produkty związane z wirulencją, geny kodujące oporność na antybiotyki, metabolizm i syntezę błon. W pęcherzykach wydzielanych przez bakterie Gram-dodatnie również znaleziono DNA m.in. *Clostridium perfringens* [44], *Streptococcus* spp. [68, 91] i *Lactobacillus reuteri* [33]. W pęcherzykach błonowych wydzielanych przez *C. perfringens* wykryto 100-nukleotydowy fragment 16S RNA oraz gen toksyny alfa i perfrinolizyny [44]. Choć nie jest pewne, w jaki sposób DNA jest pakowane do wnętrza pęcherzyków, zawartość DNA w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych *Streptococcus* spp. zmienia się na różnych etapach wzrostu, co sugeruje, że proces ten może być regulowany podczas wzrostu bakterii [68]. W bakteryjnych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych identyfikuje się ponadto różne typy RNA, tj. rRNA, mRNA, tRNA i sRNA (small RNA, mały RNA). Bardzo często występują tylko krótkie sekwencje RNA o długości do 250 nukleotydów [111], które dostają się do światła pęcherzyków najprawdopodobniej w czasie ich biogenezy. RNA jest „zaciągane” do wnętrza tworzącego się pęcherzyka wraz z cytoplazmą, podczas gdy mechanizmy pobierania DNA nadal pozostają niejasne. Dokładny mechanizm transportu fragmentów DNA do przestrzeni peryplazmatycznej, skąd „odpączkują” pęcherzyki pozostaje nadal nieznany. Możliwe, że swobodnie dyfundujący DNA zostaje wchłaniany do peryplazmy z przestrzeni zewnątrzkomórkowej [60, 90, 101]. Struktura pęcherzyka – otoczenie przez dwuwarstwą lipidową – chroni kwasy nukleinowe przed degradacją przez nukleazy, co ułatwia ich dostarczenie do komórek docelowych. Wykazano, że RNA zawarte w pęcherzykach jest funkcjonalne, gdyż po jego dostarczeniu w komórkach docelowych obserwowano zmiany fenotypowe [23]. Udokumentowano także, że pęcherzyki mogą pośredniczyć w horyzontalnym transferze genów między bakteriami, co podkreśla ich rolę jako nośników informacji genetycznej. Badania wskazują też na rolę pęcherzyków w komunikacji między komórkami różnych gatunków bakterii dzięki obecności cząsteczek sygnałowych quorum sensing informujących o stanie zagęszczenia populacji. W pęcherzykach błonowych wydzielanych przez patogeny *Porphyromonas gingivalis* i *Treponema denticola* wykryto sRNA, który hamował ekspresję niektórych cytokin w komórkach T – Jurkat [18]. Uważa się, że EV są ważnym

źródłem mikrobiologicznego RNA, który może modulować odpowiedź odpornościową podczas infekcji. Warto podkreślić, że mRNA drobnoustrojów wykryte w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych są klasyfikowane jako *vita*-PAMP (wzorce molekularne związane z patogenem), ponieważ świadczą o żywotności drobnoustrojów [98].

## REGULACJA GENETYCZNA

Nadal brakuje jednoznacznych danych dotyczących regulacji genetycznej wydzielania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez bakterie. Za pomocą badań przesiewowych zidentyfikowano geny wpływające na wytwarzanie pęcherzyków przez *E. coli* [72]. Jak dotąd nie udało się jednak wyizolować mutantu, który nie uwalniałby pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, co wskazuje, że ich tworzenie jest jedynie częściowo regulowane genetycznie i może być inicjowane przez procesy fizyczne i biochemiczne.

Równie niewiele jest informacji na temat regulacji genetycznej biogenezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych bakterii Gram-dodatnich. Badania wskazują, że w regulację mechanizmów biogenezy pęcherzyków u *Listeria monocytogenes* zaangażowany jest czynnik transkrypcji  $\sigma B$  [63]. Doświadczenia prowadzone na szczepie dzikim *L. monocytogenes* i mutancie delecyjnym w genie *sigB*, kodującym alternatywny czynnik sigma polimerazy RNA  $\sigma B$ . Czynnik ten jest głównym regulatorem odpowiedzi na stres w komórkach *Listeria*. Odpowiada także za ekspresję internaliny B (InlB), która jest kluczowa dla inwazji bakteryjnej oraz ekspresję pozytywnego regulatora transkrypcji A (PrfA) wpływającego na biosyntezę listeriolizyny O [80]. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wyizolowane z dzikiego szczepu *L. monocytogenes* zawierały trzykrotnie więcej InlB, niż pęcherzyki pochodzące ze zmutowanego szczepu  $\sigma B$ . Ekspresja listeriolizyny O związana z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi pozostawała taka sama w obu szczepach wskazując, że  $\sigma B$  może się przyczyniać do regulacji ich zawartości [63]. Mutacja czynnika  $\sigma B$  zmniejszała wytwarzanie pęcherzyków, a powstające struktury były zdeformowane w porównaniu do pęcherzyków szczepu dzikiego. Różnice te sugerują, że czynnik  $\sigma B$  odgrywa rolę w biogenezie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych *L. monocytogenes* [14].

Natomiast w komórkach *M. tuberculosis* gen *rv0431* odpowiada m.in. za regulację uwalniania pęcherzyków i z tego powodu został nazwany *virR* (vesiculogenesis and immune response regulator). Produkt tego genu – VirR jest cytoplazmatycznym białkiem, które kontroluje biogenezy pęcherzyków i reguluje uwalnianie czynników immunomodulujących. Białko to oddziałuje z błoną komórkową i co najmniej jedną lipoproteiną zawartą w pęcherzykach. Jednocześnie jest ono częścią złożonego kompleksu białkowego, który kontroluje tworzenie się pęcherzyków i selekcję ich zawartości [88]. Związek między VirR, a zależną od żelaza regulacją wytwarzania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wymaga dalszych badań. Wiadomo, że ekspresja *virR* jest obniżona w odpowiedzi na niedobór żelaza [59]. Jest zatem możliwe, że obniżona ekspresja przyczynia się

do wzmożonego wytwarzania pęcherzyków przez *M. tuberculosis*, przy ograniczonej dostępności żelaza [35].

Należy podkreślić, że na tworzenie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych mają także wpływ różne czynniki zewnętrzne, m.in. skład pożywki, faza wzrostu, temperatura, dostępność tlenu czy żelaza oraz ekspozycja na antybiotyki [109].

## UDZIAŁ PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH W ODDZIAŁYWANIACH MIĘDZY KOMÓRKAMI BAKTERII

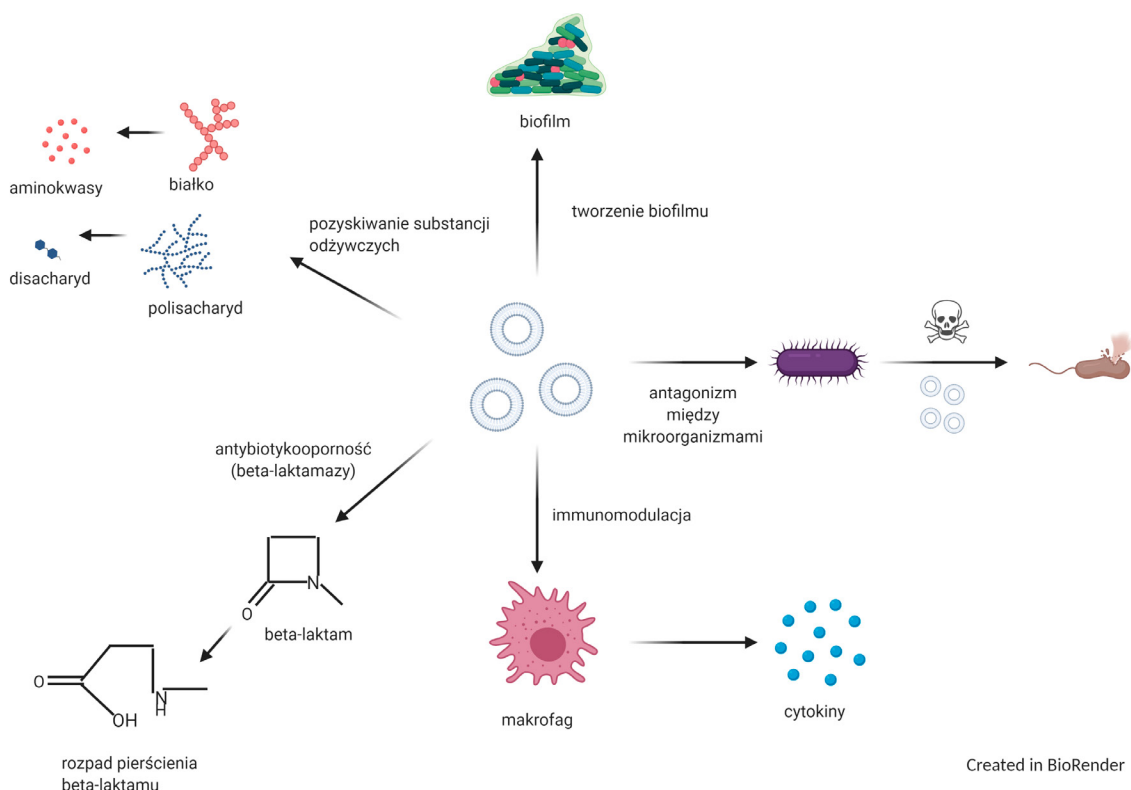
Choć pierwotnie pęcherzyki uznawano za komórkowe odpady lub produkty „odnawiania” błon, to kolejne wyniki badań wykazały, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu komórek bakteryjnych i interakcjach między nimi. Liczne biologiczne szlaki sygnałowe funkcjonują dzięki cząsteczkom syntetyzowanym przez komórki, a następnie uwalnianiu ich do środowiska pozakomórkowego. Często są one trudno rozpuszczalne bądź nietrwałe oraz wymagają odpowiedniego stężenia i ukierunkowania w celu zapewnienia prawidłowej transmisji sygnału. Dlatego też komórki bakteryjne mają zdolność „kapsułkowania” tych biocząsteczek wewnątrz mikropecherzyków, które są wydzielane na zewnątrz komórki [15].

### Funkcja ochronna

Istotną funkcją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez bakterie jest ochrona „społeczności drobnoustrojów” przed szkodliwymi dla nich czynnikami, m.in.: reaktywnymi formami tlenu, antybiotykami czy bakteriofagami. Przykładem takiej aktywności mogą być pęcherzyki zewnątrzkomórkowe *Helicobacter pylori* stanowiące mechanizm ochronny przed reaktywnymi formami tlenu uwalnianymi przez komórki układu immunologicznego gospodarza np. makrofagi czy granulocyty. Pęcherzyki pochodzące z różnych szczepów *H. pylori* wykazywały selektywne wzbogacenie w katalazę (KatA) w porównaniu do zewnętrznej błony komórkowej, co powodowało ich większą aktywność hydrolizy  $H_2O_2$  niż lizaty całych komórek. Taka właściwość pęcherzyków pozwala na ochronę drobnoustrojów przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [64].

Jak już wspomniano, „ładunek” transportowany przez pęcherzyki może zawierać białka pełniące zróżnicowane funkcje, w tym enzymy. Jednym z nich jest enzym OXA-58 należący do klasy D  $\beta$ -laktamaz warunkujący oporność szczepów *Acinetobacter baumannii* na antybiotyki z grupy karbapenemów [69] (ryc. 3). Jak już wspomniano pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą pośredniczyć w horyzontalnym transferze genów. DNA niosący liczne geny kodujące  $\beta$ -laktamazy *A. baumannii*, może zostać przekazany nie tylko komórkom tego samego gatunku, ale także innym gatunkom, np. komórkom *E. coli*, przyczyniając się do szerzenia oporności na antybiotyki [17, 97]. Badania z udziałem patogennych *E. coli* O157:H7 wykazały, że zarówno liniowe chromosomalne DNA jak i plazmidy mogą być „upakowane” we wnętrzu pęcherzyków





**Ryc. 3.** Przykłady oddziaływań bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórkami prokariotycznymi i eukariotycznymi

i przenoszone do komórek szczepów niepatogennych zwiększając ich wirulencję oraz generując antybiotykooporność [15, 116].

### Pozyskiwanie substancji odżywczych

Uwalnianie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez bakterie pozwala na przekazywanie substancji potrzebnych do funkcjonowania drobnoustrojów zarówno tego samego jak i innych gatunków zasiedlających tę samą niszę. W ludzkim mikrobiomie jelitowym licznie występują bakterie z rodzaju *Bacteroides*, a każdy z gatunków ma odmienne możliwości wykorzystania polisacharydów pochodzących z treści jelitowej [26]. Zależy to od genów określanymi jako PUL (polysaccharide utilization loci), które kodują białka powierzchniowe i regulatorowe, zdolne do wiązania, rozszczepiania lub importowania określonych polisacharydów oraz produktów ich rozkładu do postaci łatwiej przyswajalnych przez bakterie oraz komórki nabłonka jelitowego [86] (ryc. 3). Porównawcza analiza proteomiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i błon wewnętrznych u *Bacteroides fragilis* i *B. thetaiotaomicron* umożliwiła zidentyfikowanie grup białek znajdujących się wyłącznie w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych lub błonie zewnętrznej. Białka pęcherzyków były szczególnie wzbogacone w kodowane przez PUL kwaśne lipoproteiny o aktywności hydrolitycznej i zdolności wiązania węglowodanów [26, 113]. Pozwala to na rozkład polisacharydów, a powstałe produkty mogą być metabolizowane przez wszystkie obecne w pobliżu szczepy bakterii,

również niewytwarzające pęcherzyków. Takie wzbogacenie pęcherzyków w enzymy hydrolityczne kodowane przez geny PUL sugeruje istnienie mechanizmu selektywnego upakowywania niektórych białek w celu zapewnienia działania poza komórką [15, 26].

### Antagonizm między mikroorganizmami

Uwalnianie pęcherzyków przez bakterie może stanowić skuteczną broń przeciwko innym drobnoustrojom. Taki mechanizm zachodzi m.in. u *P. aeruginosa*, który wytwarza pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zawierające liczne czynniki wirulencji w celu eliminowania komórek gospodarza oraz innych komórek bakteryjnych, np.: proteazy, hemolizyny, fosfolipazę C, fosfatazy alkaliczne oraz chinolony i hydrolazy mureinowe [66, 71, 106]. Hydrolazy peptydoglikanu zawarte w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych mogą rozkładać peptydoglikan ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich prowadząc do lizy komórki [46, 47] (ryc. 3). Natomiast w kontakcie z innymi bakteriami Gram-ujemnymi następuje fuzja pęcherzyków *P. aeruginosa* z błoną wewnętrzną komórek gatunku antagonicznego i uwolnienie z ich wnętrza enzymów trawiących i toksyn do peryplazmy [15, 67]. Innym przykładem może być bakteriocyna zawarta w pęcherzykach błonowych *Lactobacillus acidophilus*, która hamuje wzrost i podziały komórkowe innego konkurencyjnego szczepu *Lactobacillus (L. delbrueckii)* znajdującego się w mikrobiomie jelitowym [24].

## Udział w rozprzestrzenianiu się bakteriofagów

Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą także pośredniczyć w rozprzestrzenianiu się bakteriofagów. Wymiana receptorów fagów może zachodzić w sposób międzygatunkowy, ułatwiając w ten sposób przyłączanie się fagów do gatunków innych niż komórki gospodarza. Komórki *Bacillus subtilis* odporne na fagi stały się wrażliwe, otrzymując receptory fagowe przenoszone przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe generowane z wrażliwych szczepów bakterii [112]. Ponadto, wewnątrz pęcherzyków wydzielanych przez *B. subtilis* znaleziono cząstki fagowe które mogą potencjalnie stanowić nową drogę przedostawania się fagów do innych szczepów bakterii [108].

## Udział pęcherzyków w funkcjonowaniu biofilmu

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą również zawierać hydrofobowe cząsteczki odpowiedzialne za komunikację między poszczególnymi komórkami tzw. sygnały „quorum sensing” i tworzenie biofilmu. Takie silnie hydrofobowe cząsteczki, nierozpuszczalne w roztworach wodnych, zamknięte w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, mogą się przemieszczać na duże odległości i pośredniczyć w przekazywaniu informacji między komórkami bakterii. Przykładem takiej cząsteczki może być PQS (pseudomonas quinolone signal), lakton homoseryny. PQS reguluje ekspresję wielu genów odpowiedzialnych za ruchliwość, wirulencję i tworzenie biofilmu. Komunikacja odbywa się w wyniku fuzji pęcherzyków z komórką docelową i uwolnienia cząsteczek sygnałowych. Co ciekawe quorum sensing zaobserwowano również u bakterii Gram-dodatnich – *B. subtilis* [110].

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są ważnym składnikiem macierzy biofilmu wielu gatunków bakterii, w tym *P. aeruginosa*, *H. pylori* i *Myxococcus xanthus* [79, 99, 117] (ryc. 3). Biofilmy bakteryjne często składają się ze społeczności, które mogą zawierać wiele różnych gatunków drobnoustrojów. W takiej strukturze, jeden gatunek bakterii, jako element macierzy biofilmu może przynosić innemu gatunkowi korzyści w postaci pozyskiwania składników odżywczych lub zwiększonych szans na przeżycie. Relacje takie przyczyniają się do poprawy ogólnej funkcji biofilmu [15, 29, 99]. *P. aeruginosa* wydziela inne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (różnice ilościowe i jakościowe) z komórek planktonicznych, a inne z komórek rosnących w postaci biofilmu. Pęcherzyki te wykazują aktywność proteolityczną i zdolność wiązania antybiotyków, co wskazuje na ich udział w tworzeniu biofilmów [99]. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzące z komórek komensalnych bakterii *Lactobacillus reuteri*, z hodowli planktonicznej i rosnących w postaci biofilmu zawierały DNA i miały różne rozmiary [33]. W biofilmach tworzonych przez *P. aeruginosa* obecne są pęcherzyki zawierające DNA, który jest uwalniany specyficznie, w późnej fazie logarytmicznego wzrostu hodowli w odpowiedzi na sygnały quorum sensing. Proces ten zachodzi prawdopodobnie przez lizę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zawierających DNA [4]. Zdolność do tworzenia biofilmu szczepu *H. pylori* TK1402, w porównaniu do innych

szczepów tego gatunku, była skorelowana z wytwarzaniem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych [117]. Zaobserwowano też, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z jednego organizmu mogą również ułatwiać adhezję innych organizmów do biofilmu; na przykład pęcherzyki patogenu jamy ustnej *Porphyromonas gingivalis* mogą zwiększać agregację i adhezję wielu innych mikroorganizmów jamy ustnej w biofilmach płytki nazębnej [15, 48, 102].

## UDZIAŁ PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH W ODDZIAŁYWANIACH MIĘDZY KOMÓRKAMI EUKARIOTYCZNYMI

Bakterie patogenne wydzielają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, zawierające czynniki wirulencji lub inne modulatory komórkowe. Ich wytwarzanie zaobserwowano zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.

### Rola w patogenezie

Białka związane z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi mogą wpływać pro- lub przeciwzapalnie w układzie odpornościowym gospodarza. *P. gingivalis* preferencyjnie upakuje do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych białka nazywane gingipainami, które należą do proteaz i stanowią jego główne czynniki wirulencji [37]. Gingipainy degradują cytokiny w celu osłabienia stanu zapalnego u gospodarza i jego odpowiedzi immunologicznej. Odwrotne działanie wykazują pęcherzyki zewnątrzkomórkowe uwalniane przez *Campylobacter jejuni*, które nasilają odpowiedź odpornościową przez eksport szesnastu immunogennych glikoprotein [28]. Pęcherzyki enterotoksycznych szczepów *E. coli* (ETEC, enterotoxigenic *E. coli*) zawierają znaczne ilości aktywnej fizjologicznie toksyny termolabilnej (LT, heat-labile toxin) [41]. Doniesienia wskazują, że rozpuszczalna LT pochodząca z peryplazmy szczepów ETEC wywołuje podobną odpowiedź cytokinową jak toksyna LT, która jest związana z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi, jednak proces ten zachodzi w wyniku innej aktywacji [19]. Porównanie między dwoma sposobami eksportu wykazuje różnice kinetyczne w aktywacji czynnika transkrypcji CREB (CREB-cAMP response element-binding protein). Dzieje się tak prawdopodobnie ze względu na różnice w sposobie prezentacji toksyn przez komórki. Natomiast komórki makrofagów wykrywają zarówno lipidowe, jak i białkowe składniki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych *P. aeruginosa*, co prowadzi do swoistej dla danego szczepu odpowiedzi odpornościowej [13, 27].

### Wpływ na układ odpornościowy

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez bakterie po zakażeniu, wchodzi w interakcje z komórkami układu odpornościowego, w tym związanymi z odpornością wrodzoną. Badania wykazały, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe *Neisseria meningitidis* mogą stymulować neutrofile, powodując wytwarzanie TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  oraz nadmierne wytwarzanie CXCL8, CCL3 i CCL4 [61]. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez *Legionella pneumophila* aktywują zaś wytwarzanie cytokin prozapalnych przez

makrofagi [42, 43], a białka zawarte w mikropecherzykach *H. pylori* wykazują zdolność indukowania degranulacji ludzkich eozynofili [55]. Komórki prezentujące antygen, które stanowią główne połączenie odporności wrodzonej i nabytej mogą być aktywowane przez pecherzyki zewnątrzkomórkowe. Przykładowo pecherzyki zewnątrzkomórkowe wytwarzane przez *Salmonella* spp. indukowały ekspresję cząsteczek kostymulujących CD86 i MHC klasy II na komórkach dendrytycznych oraz wytwarzanie TNF- $\alpha$  i IL-12, a także promowały rozwój odpowiedzi limfocytów T oraz B [3]. Podobna zależność występowała w przypadku pecherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez *E. coli*; następował zwiększony wychwyt przez komórki dendrytyczne, wytwarzanie IL-6, IL-1 $\beta$  oraz indukcja przeciwciał *in vivo* [52]. Oddziaływania te zachodzą również z innymi komórkami gospodarza, w tym z komórkami śródbłonna i płytkami krwi. Pecherzyki zewnątrzkomórkowe *E. coli* powodują zwiększenie syntezy transbłonowego białka ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), selektyny E i cząsteczki adhezji śródbłonna naczyniowego (VCAM-1), a także wzmacniają wiązanie leukocytów z ludzkimi mikrocząsteczkami komórkami śródbłonna [50]. Dzięki tak silnej stymulacji, zarówno wrodzonej jak i nabytej odporności bakteryjne pecherzyki zewnątrzkomórkowe wydają się odpowiednimi kandydatami do wykorzystania w projektowaniu szczepionek przeciwbakteryjnych [115].

### Korzystne interakcje z komórkami gospodarza

Wykazano, że pecherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez probiotyczny szczep *E. coli* Nissle chronią przed biegunkami [5]. Probiotyczne szczepy *Lactobacillus* poprzez mikropecherzyki stymulują komórki dendrytyczne, modulują wytwarzanie cytokin i stymulują wytwarzanie przeciwciał klasy IgA, co wpływa korzystnie na mikrobiotę jelit. Ponadto pecherzyki zewnątrzkomórkowe mogą przenikać przez barierę nabłonkową jelit i migrować do innych narządów lub wchodzić w interakcje z układem odpornościowym gospodarza [10, 51]. Bakterie probiotyczne z powodu immunomodulującego wpływu na układ odpornościowy i bezpieczeństwo stosowania są dobrymi kandydatami do zwiększania tolerancji na alergeny. Wykazano, że komórki dendrytyczne stymulowane pecherzykami błonowymi wydzielanymi przez *Bifidobacterium bifidum* indukowały tworzenie komórek T regulatorowych z naiwnych komórek T. Wyniki te wskazują na potencjalne zastosowanie tych nanostruktur w swojej alergologii immunoterapii [70]. Wykazano również właściwości przeciwnowotworowe bakteryjnych pecherzyków zewnątrzkomórkowych, m.in. mikropecherzyki wydzielane przez *L. rhamnosus* działały cytotoksycznie na komórki nowotworowe wątroby [10].

## BIOMEDYCZNE ZASTOSOWANIA BAKTERYJNYCH PECHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

### Projektowanie szczepionek

Pecherzyki zewnątrzkomórkowe biorą udział w transporcie toksyn oraz czynników wirulencji wytwarzanych przez bakterie do komórek gospodarza, co wywołuje indukcję

odpowiedzi odpornościowej. Dzięki takim właściwościom pecherzyki mogłyby zostać wykorzystane do swoistego „trenowania” układu odpornościowego w celu sprawnego rozpoznania i zwalczania patogenów. Poza tym, dzięki silnej stymulacji zarówno wrodzonej jak i nabytej odporności, bakteryjne pecherzyki zewnątrzkomórkowe wydają się odpowiednimi kandydatami do wykorzystania w projektowaniu szczepionek przeciwko infekcjom [115].

W technologii wytwarzania szczepionek istotną rolę pełnią adiuwanty. Są stosowane powszechnie w celu zwiększenia odpowiedzi immunologicznej. Inaktywowane antygeny szczepionkowe bez adiuwanta na ogół nie wywołują wystarczającego zwiększenia i wydłużenia czasu utrzymywania się odpowiedzi humoralnej związanej z wytworzeniem swoistych przeciwciał. Obecność adiuwantów pozwala na zmniejszenie ilości podawanego antygeny w pojedynczej dawce, a także zmniejszenie liczby dawek przypadających na dany schemat szczepienia [32]. Podejmowane są próby wykorzystywania pecherzyków jako adiuwantów w konstruowaniu szczepionek, przede wszystkim pochodzących z pecherzyków zewnątrzkomórkowych *E. coli*. Jednym z przykładów może być kowalencyjne połączenie tych pecherzyków z antygenami malarii w celu pozyskania nowej szczepionki donosowej. Wyniki potwierdziły, że istnieje możliwość wykorzystania pecherzyków jako adiuwantów, o porównywalnej aktywności z adiuwantem toksyny cholery [85]. Ponadto, pecherzyki mogą być połączone nie tylko z białkami; badania wykazują, że pecherzyki wydzielane przez *N. meningitidis* można łączyć z lipopolisacharydami *Shigella*, aby uzyskać odporność na zapalenie rogówki i spojówki o tej etiologii [78].

Potencjał bakteryjnych pecherzyków zewnątrzkomórkowych potwierdzono w zaawansowanych fazach badań klinicznych nad szczepionką przeciw meningokokom grupy B-4CMenB (four-component meningococcal group B). Szczepionka ta zawiera trzy rekombinowane białka powierzchniowe: białko fuzyjne NHBA (antygen *Neisseria* wiążący heparynę), fHbp (białko wiążące czynnik H) oraz białko NadA i pecherzyki błony zewnętrznej szczepu *N. meningitidis* New Zealand (NZ OMV) [40]. Warto wspomnieć, że szczepionkę na bazie NZ OMV stosowano skutecznie w Nowej Zelandii w latach 2004–2008 w celu ograniczenia panującej tam epidemii. Preparat 4CMenB, został po raz pierwszy dopuszczony do obrotu w Europie w 2013 r. oraz w Stanach Zjednoczonych w 2015 r, w krajach europejskich do stosowania u niemowląt od 2 miesiąca życia. Preparaty zawierające pecherzyki zewnątrzkomórkowe *N. meningitidis* grupy B charakteryzowały się efektywnością w zakresie 83–85%, co czyni 4CMenB istotnym narzędziem zapobiegania infekcjom o tej etiologii, a także jest potwierdzeniem dużego potencjału bakteryjnych pecherzyków zewnątrzkomórkowych w wakcynologii [115].

### Pecherzyki zewnątrzkomórkowe jako nośniki substancji terapeutycznych

Badania nad skutecznymi nośnikami leków, mającymi zadowalającą biodostępność przy jednoczesnym wysokim

indeksie terapeutycznym, to jeden z istotniejszych kierunków rozwoju technologii postaci środków leczniczych. Funkcję nośników leków mogą z powodzeniem pełnić zróżnicowane nanomateriały, w tym polimery, liposomy oraz materiały węglowe. Chcąc osiągnąć założenia terapii celowanej, uzyskując jednocześnie kontrolowane dostarczanie leku, niezbędne jest pozyskanie nośnika wykazującego pożądane właściwości. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, ze względu na niewielkie wymiary i biokompatybilność ich dwuwarstwy lipidowej z błonami komórkowymi są obiecującymi kandydatami na nośniki leków. W badaniach z wykorzystaniem szczepu *E. coli* zmodyfikowanego metodami inżynierii genetycznej pozyskano pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zawierające na powierzchni kompleks cząsteczek „anti-HER2 affibody” z cytolizyną A [22, 34]. Pęcherzyki te były „ukierunkowane” na komórki nowotworowe wykazujące ekspresję receptora HER-2. Do wnętrza pęcherzyków metodą elektroporacji wprowadzono cząsteczki siRNA (small interfering RNA, mały interferujący RNA), którego celem molekularnym jest mRNA białka KSP (kinesin spindle protein). Taki konstrukt po osiągnięciu celu uwalnia zawartość do wnętrza komórki wywołując efekt cytotoksyczny. Pomimo niedużej wydajności „ładowania”, zawartość siRNA w zmodyfikowanych pęcherzykach była wystarczająca do osiągnięcia działania cytotoksycznego na komórki HER2-dodatnie. Było to możliwe dzięki selektywnej kumulacji pęcherzyków po podaniu w miejscu guza. Powstałe dzięki metodom inżynierii pęcherzyki zewnątrzkomórkowe cechowały się niską toksycznością oraz dużą skutecznością, co czyni je obiecującymi kandydatami do wykorzystania jako nośniki leków [115].

Innym istotnym zastosowaniem bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w leczeniu może być transport enzymów. Dotychczas, ze względu na degradację enzymów terapeutycznych w surowicy, osiągnięcie przez nie celu biologicznego było znacznie utrudnione. „Upakowanie” w świetle pęcherzyków mogłoby się przyczynić do poprawy ich stabilności, a przez to zwiększenia skuteczności terapii. W badaniach przeprowa-

dzonych przez grupę naukowców ze Stanów Zjednoczonych fosfotriesteraza wyizolowana z *Brevundimonas diminuta* zawierająca dwujądrowe miejsce aktywne Zn/Zn była selektywnie upakowywana w pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, natomiast w celu właściwego zakotwiczenia enzymu wykorzystano białko OmpA. Wykazano, że fosfotriesteraza związana w pęcherzykach charakteryzowała się kinetyką zbliżoną do natywnego enzymu i nie wykazywała zmiany aktywności enzymatycznej [6, 8].

## PODSUMOWANIE

Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe cieszą się dużym zainteresowaniem świata nauki ze względu na ich potencjalne wykorzystanie w wakcynologii i terapii celowanej. Ostatnio powstało nawet specjalistyczne czasopismo przeznaczone do badań pęcherzyków zewnątrzkomórkowych – *Journal of Extracellular Vesicles*, odbywają się również regularne konferencje międzynarodowe poświęcone tej tematyce. Mechanizmy regulacji biogenezy tych nanostruktur oraz sam proces nadal pozostają nie do końca wyjaśnione i wymagają dalszych badań, zwłaszcza u bakterii Gram-dodatnich oraz mykobakterii. Nowoczesne techniki bazujące na spektrometrii mas, ultra- i wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz metody biologii molekularnej i sekwencjonowania NGS stanowią ważne narzędzia dające możliwość charakteryzowania profilu lipidowego, białkowego oraz zawartości kwasów nukleinowych w bakteryjnych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych. Jest to niezbędne do określenia ich potencjalnej przydatności terapeutycznej. Liczne badania naukowe koncentrują się na projektowaniu zawartości molekularnej pęcherzyków zarówno w ich wnętrzu, jak i na powierzchni, dzięki czemu mogą stać się w przyszłości istotną gałęzią farmakologii. Współczesne techniki inżynierii genetycznej pozwalają na programowanie komórek bakteryjnych, w celu zamieniania ich w prężne mikrofabryki pęcherzyków o pożądanym składzie, co sprawi, że będą bardzo użyteczne w różnych sektorach przemysłu biotechnologicznego.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Agrawal A., Ramachandran R.: Exploring the links between lipid geometry and mitochondrial fission: Emerging concepts. *Mitochondrion*, 2019; 49: 305–313
- [2] Ahmadi Badi S., Bruno S.P., Moshiri A., Tarashi S., Siadat S.D., Masotti A.: Small RNAs in outer membrane vesicles and their function in host-microbe interactions. *Front. Microbiol.*, 2020; 11: 1209
- [3] Alaniz R.C., 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.*, 2007; 179: 7692–7701
- [4] Allesen-Holm M., Barken K.B., Yang L., Klausen M., Webb J.S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T.: A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.*, 2006; 59: 1114–1128
- [5] Alvarez C.S., Badia J., Bosch M., Giménez R., Baldomà L.: Outer membrane vesicles and soluble factors released by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and commensal ECOR63 enhance barrier function by regulating expression of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Front. Microbiol.*, 2016; 7: 1981
- [6] Alves N.J., Turner K.B., Daniele M.A., Oh E., Medintz I.L., Walper S.A.: Bacterial nanobioreactors-directing enzyme packaging into bacterial outer membrane vesicles. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015; 7: 24963–24972
- [7] Alves N.J., Turner K.B., DiVito K.A., Daniele M.A., Walper S.A.: Affinity purification of bacterial outer membrane vesicles (OMVs) utilizing a His-tag mutant. *Res. Microbiol.*, 2017; 168: 139–146
- [8] Alves N.J., Turner K.B., Medintz I.L., Walper S.A.: Protecting enzymatic function through directed packaging into bacterial outer membrane vesicles. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 24866

- [9] Araiza-Villanueva M., Avila-Calderón E.D., Flores-Romo L., Calderón-Amador J., Sriranganathan N., Qublan H.A., Witonsky S., Aguilera-Arreola M.G., Ruiz-Palma M.D., Ruiz E.A., Suárez-Güemes F., Gómez-Lunar Z., Contreras-Rodríguez A.: Proteomic analysis of membrane blebs of *Brucella abortus* 2308 and RB51 and their evaluation as an acellular vaccine. *Front. Microbiol.*, 2019; 10: 2714
- [10] Behzadi E., Mahmoodzadeh Hosseini H., Imani Fooladi A.A.: The inhibitory impacts of *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived extracellular vesicles on the growth of hepatic cancer cells. *Microb. Pathog.*, 2017; 110: 1–6
- [11] Berleman J.E., Allen S., Danielewicz M.A., Remis J.P., Gorur A., Cunha J., Hadi M.Z., Zusman D.R., Northen T.R., Witkowska H.E., Auer M.: The lethal cargo of *Myxococcus xanthus* outer membrane vesicles. *Front. Microbiol.*, 2014; 5: 474
- [12] Bitto N.J., Chapman R., Pidot S., Costin A., Lo C., Choi J., D’Cruze T., Reynolds E.C., Dashper S.G., Turnbull L., Whitchurch C.B., Stinear T.P., Stacey K.J., Ferrero R.L.: Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Sci. Rep.*, 2017; 7: 7072
- [13] Bonnington K.E., Kuehn M.J.: Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014; 1843: 1612–1619
- [14] Brown L., Wolf J.M., Prados-Rosales R., Casadevall A.: Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015; 13: 620–630
- [15] Caruana J.C., Walper S.A.: Bacterial membrane vesicles as mediators of microbe – microbe and microbe – host community interactions. *Front. Microbiol.*, 2020; 11: 432
- [16] Chatterjee S.N., Das J.: Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.*, 1967; 49: 1–11
- [17] Chatterjee S., Mondal A., Mitra S., Basu S.: *Acinetobacter baumannii* transfers the blaNDM-1 gene via outer membrane vesicles. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2017; 72: 2201–2207
- [18] Choi E.J., Lee H.G., Bae I.H., Kim W., Park J., Lee T.R., Cho E.G.: *Propionibacterium acnes*-derived extracellular vesicles promote acne-like phenotypes in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 2018; 138: 1371–1379
- [19] Chutkan H., Kuehn M.J.: Context-dependent activation kinetics elicited by soluble versus outer membrane vesicle-associated heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.*, 2011; 79: 3760–3769
- [20] Clarke A.J.: The “hole” story of predatory outer-membrane vesicles. *Can. J. Microbiol.*, 2018; 64: 589–599
- [21] Daffé M.: The cell envelope of tubercle bacilli. *Tuberculosis*, 2015; 95: S155–S158
- [22] Daniele L., Sapino A.: Anti-HER2 treatment and breast cancer: State of the art, recent patents, and new strategies. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, 2009; 4: 9–18
- [23] Dauros-Singorenko P., Blenkinson C., Phillips A., Swift S.: The functional RNA cargo of bacterial membrane vesicles. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2018; 365: fny023
- [24] Dean S.N., Rimmer M.A., Turner K.B., Phillips D.A., Caruana J.C., Hervey W.J., Leary D.H., Walper S.A.: *Lactobacillus acidophilus* membrane vesicles as a vehicle of bacteriocin delivery. *Front. Microbiol.*, 2020; 11: 710
- [25] Devos S., Van Putte W., Vitse J., Van Driessche G., Stremersch S., Van Den Broek W., Raemdonck K., Braeckmans K., Stahlberg H., Kudryashev M., Savvides S.N., Devreese B.: Membrane vesicle secretion and prophage induction in multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in response to ciprofloxacin stress. *Environ. Microbiol.*, 2017; 19: 3930–3937
- [26] Elhenawy W., Debely M.O., Feldman M.F.: Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into *Bacteroides* outer membrane vesicles. *mBio*, 2014; 5: e00909–14
- [27] 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.*, 2010; 78: 3822–3831
- [28] Elmi A., Watson E., Sandu P., Gundogdu O., Mills D.C., Inglis N.F., Manson E., Imrie L., Bajaj-Elliott M., Wren B.W., Smith D.G., Dorrell N.: *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles play an important role in bacterial interactions with human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2012; 80: 4089–4098
- [29] Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S.: Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2016; 14: 563–575
- [30] Gao W., Fang R.H., Thamphiwatana S., Luk B.T., Li J., Angsantikul P., Zhang Q., Hu C.M., Zhang L.: Modulating antibacterial immunity via bacterial membrane-coated nanoparticles. *Nano Lett.*, 2015; 15: 1403–1409
- [31] Gatkowska J., Długońska H.: Rola zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych w interakcji pasożyt-żywicieli. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2016; 70: 951–958
- [32] Gołoś A., Lutyńska A.: Adiuwenty glinowe w szczepionkach – aktualny stan wiedzy. *Przegl. Epidemiol.*, 2015; 69: 871–874
- [33] Grande R., Celia C., Mincione G., Stringaro A., Di Marzio L., Colone M., Di Marcantonio M.C., Savino L., Puca V., Santoliquido R., Locatelli M., Muraro R., Hall-Stoodley L., Stoodley P.: Detection and physicochemical characterization of membrane vesicles (MVs) of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *Front. Microbiol.*, 2017; 8: 1040
- [34] Gujrati V., Kim S., Kim S.H., Min J.J., Choy H.E., Kim S.C., Jon S.: Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy. *ACS Nano*, 2014; 8: 1525–1537
- [35] Gupta S., Rodriguez G.M.: Mycobacterial extracellular vesicles and host pathogen interactions. *Pathog. Dis.*, 2018; 76: fty031
- [36] Hashimoto M., Matsumoto T., Tamura-Nakano M., Ozono M., Hashiguchi S., Suda Y.: Characterization of outer membrane vesicles of *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283. *J. Biosci. Bioeng.*, 2018; 125: 425–431
- [37] 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.*, 2011; 286: 1269–1276
- [38] Haurat M.F., Elhenawy W., Feldman M.F.: Prokaryotic membrane vesicles: New insights on biogenesis and biological roles. *Biol. Chem.*, 2015; 396: 95–109
- [39] Hoekstra D., van der Laan J.W., de Leij L., Witholt B.: Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976; 455: 889–899
- [40] Holst J., Oster P., Arnold R., Tatley M.V., Næss L.M., Aaberge I.S., Galloway Y., McNicholas A., O’Hallahan J., Rosenqvist E., Black S.: Vaccines against meningococcal serogroup B disease

containing outer membrane vesicles (OMV): Lessons from past programs and implications for the future. *Hum. Vaccin. Immunother*, 2013; 9: 1241–1253

[41] Horstman A.L., Bauman S.J., Kuehn M.J.: Lipopolysaccharide 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) core determines bacterial association of secreted toxins. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 8070–8075

[42] Jäger J., Marwitz S., Tiefenau J., Rasch J., Shevchuk O., Kugler C., Goldmann T., Steinert M.: Human lung tissue explants reveal novel interactions during *Legionella pneumophila* infections. *Infect. Immun.*, 2013; 82: 275–285

[43] Jeon J., Park S.C., Her J., Lee J.W., Han J.K., Kim Y.K., Kim K.P., Ban C.: Comparative lipidomic profiling of the human commensal bacterium *Propionibacterium acnes* and its extracellular vesicles. *RSC Adv.*, 2018; 8: 15241–15247

[44] Jiang Y., Kong Q., Roland K.L., Curtiss R.3rd: Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2014; 304: 431–443

[45] 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.*, 1995; 177: 3998–4008

[46] Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J.: Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J. Bacteriol.*, 1996; 178: 2767–2774

[47] 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.*, 1998; 180: 2306–2311

[48] 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.*, 2003; 47: 485–491

[49] Kesty N.C., Kuehn M.J.: Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 2069–2076

[50] Kim J.H., Jeon E.J., Hong C.P., Kim S.H., Jang M.S., Lee E.J., Moon S.J., Yun C.H., Im S.H., Jeong S.G., Park B.Y., Kim K.T., Seoh J.Y., Kim Y.K., Oh S.J., i wsp.: Extracellular vesicle-derived protein from *Bifidobacterium longum* alleviates food allergy through mast cell suppression. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016; 137: 507–516

[51] Kim J.H., Yoon Y.J., Lee J., Choi E.J., Yi N., Park K.S., Park J., Lötval J., Kim Y.K., Gho Y.S.: Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* up-regulate expression of endothelial cell adhesion molecules in vitro and in vivo. *PLoS One*, 2013; 8: e59276

[52] Kim O.Y., Hong B.S., Park K.S., Yoon Y.J., Choi S.J., Lee W.H., Roh T.Y., Lötval J., Kim Y.K., Gho Y.S.: Immunization with *Escherichia coli* outer membrane vesicles protects bacteria induced lethality via Th1 and Th17 cell responses. *J. Immunol.*, 2013; 190: 4092–4102

[53] Kim O.Y., Park H.T., Dinh N.T.H., Choi S.J., Lee J., Kim J.H., Lee S.W., Gho Y.S.: Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- $\gamma$ -mediated antitumor response. *Nat. Commun.*, 2017; 8: 626

[54] Knox K.W., Vesk M., Work E.: Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1966; 92: 1206–1217

[55] Ko S.H., Jeon J.I., Kim Y.J., Yoon H.J., Kim H., Kim N., Kim J.S., Kim J.M.: *Helicobacter pylori* outer membrane vesicle proteins induce human eosinophil degranulation via a  $\beta$ 2 integrin CD11/CD18- and ICAM-1-dependent mechanism. *Mediators Inflammation*, 2015; 2015: 301716

[56] Kulkarni H.M., Jagannadham M.V.: Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 2014; 160: 2109–2121

[57] Kulkarni H.M., Swamy C.V., Jagannadham M.V.: Molecular characterization and functional analysis of outer membrane vesicles from the antarctic bacterium *Pseudomonas syringae* suggest a possible response to environmental conditions. *J. Proteome Res.*, 2014; 13: 1345–1358

[58] Kulp A., Kuehn M.J.: Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2010; 64: 163–184

[59] Kurthkoti K., Amin H., Marakalala M.J., Ghanny S., Subbian S., Sakatos A., Livny J., Fortune S.M., Berney M., Rodriguez G.M.: The capacity of *Mycobacterium tuberculosis* to survive iron starvation might enable it to persist in iron-deprived microenvironments of human granulomas. *mBio*, 2017; 8: e01092–17

[60] Langlete P., Krabberød A.K., Winther-Larsen H.C.: Vesicles from *Vibrio cholerae* contain AT-Rich DNA and shorter mRNAs that do not correlate with their protein products. *Front. Microbiol.*, 2019; 10: 2708

[61] Lapinet J.A., Scapini P., Calzetti F., Pérez O., Cassatella M.A.: Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-8, macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$ , and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 6917–6923

[62] 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*, 2009; 9: 5425–5436

[63] Lee J.H., Choi C.W., Lee T., Kim S.I., Lee J.C., Shin J.H.: Transcription factor  $\sigma$ B plays an important role in the production of extracellular membrane-derived vesicles in *Listeria monocytogenes*. *PLoS One*, 2013; 8: e73196

[64] Lekmechai S., Su Y.C., Brant M., Alvarado-Kristensson M., Vallström A., Obi I., Arnqvist A., Riesbeck K.: *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles protect the pathogen from reactive oxygen species of the respiratory burst. *Front. Microbiol.*, 2018; 9: 1837

[65] Li M., Zhou H., Yang C., Wu Y., Zhou X., Liu H., Wang Y.: Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update. *J. Controlled Release*, 2020; 323: 253–268

[66] 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.*, 1996; 178: 2479–2488

[67] Li Z., Clarke A.J., Beveridge T.J.: Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J. Bacteriol.*, 1998; 180: 5478–5483

[68] Liao S., Klein M.I., Heim K.P., Fan Y., Bitoun J.P., Ahn S.J., Burne R.A., Koo H., Brady L.J., Wen Z.T.: *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J. Bacteriol.*, 2014; 196: 2355–2366

- [69] Liao Y.T., Kuo S.C., Chiang M.H., Lee Y.T., Sung W.C., Chen Y.H., Chen T.L., Fung C.P.: *Acinetobacter baumannii* extracellular OXA-58 is primarily and selectively released via outer membrane vesicles after sec-dependent periplasmic translocation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015; 59: 7346-7354
- [70] López P., González-Rodríguez I., Sánchez B., Gueimonde M., Margolles A., Suárez A.: Treg-inducing membrane vesicles from *Bifidobacterium bifidum* LMG13195 as potential adjuvants in immunotherapy. *Vaccine*, 2012; 30: 825-829
- [71] Mashburn L.M., Whiteley M.: Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, 2005; 437: 422-425
- [72] 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.*, 2006; 188: 5385-5392
- [73] Mergenhagen S.E., Bladen H.A., Hsu K.C.: Electron microscopic localization of endotoxic lipopolysaccharide in Gram-negative organisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1966; 133: 279-291
- [74] Mug-Opstelten D., Witholt B.: Preferential release of new outer membrane fragments by exponentially growing *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978; 508: 287-295
- [75] Nagakubo T., Nomura N., Toyofuku M.: Cracking open bacterial membrane vesicles. *Front. Microbiol.*, 2020; 10: 3026
- [76] Olaya-Abril A., Prados-Rosales R., McConnell M.J., Martín-Peña R., González-Reyes J.A., Jiménez-Munguía I., Gómez-Gascón L., Fernández J., Luque-García J.L., García-Lidón C., Estévez H., Pachón J., Obando I., Casadevall A., Pirofski L.A. i wsp.: Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Proteomics*, 2014; 106: 46-60
- [77] Oliver C., Hernández M.A., Tandberg J.I., Valenzuela K.N., Lagos L.X., Haro R.E., Sánchez P., Ruiz P.A., Sanhueza-Oyarzún C., Cortés M.A., Villar M.T., Artigues A., Winther-Larsen H.C., Avendaño-Herrera R., Yáñez A.J.: The proteome of biologically active membrane vesicles from *Piscirickettsia salmonis* LF-89 type strain identifies plasmid-encoded putative toxins. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017; 7: 420
- [78] Orr N., Robin G., Cohen D., Arnon R., Lowell G.H.: Immunogenicity and efficacy of oral or intranasal *Shigella flexneri* 2a and *Shigella sonnei* proteosome-lipopolysaccharide vaccines in animal models. *Infect. Immun.*, 1993; 61: 2390-2395
- [79] 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.*, 2009; 191: 2077-2082
- [80] Parida S.K., Domann E., Rohde M., Müller S., Darji A., Hain T., Wehland J., Chakraborty T.: Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol. Microbiol.*, 2002; 28: 81-93
- [81] Park J.S., Lee W.C., Yeo K.J., Ryu K.S., Kumarasiri M., Hesk D., Lee M., Mobashery S., Song J.H., Kim S.I., Lee J.C., Cheong C., Jeon Y.H., Kim H.Y.: Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane. *FASEB J.*, 2012; 26: 219-228
- [82] Pérez-Cruz C., Carrión O., Delgado L., Martínez G., López-Iglesias C., Mercade E.: New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T: Implications for DNA content. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013; 79: 1874-1881
- [83] Prados-Rosales R., Baena A., Martínez L.R., Luque-García J., Kalscheuer R., Veeraraghavan U., Camara C., Nosanchuk J.D., Besra G.S., Chen B., Jiménez J., Glatman-Freedman A., Jacobs W.R.Jr., Porcelli S.A., Casadevall A.: Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *J. Clin. Invest.*, 2011; 121: 1471-1483
- [84] Prados-Rosales R., Weinrick B.C., Piqué D.G., Jacobs W.R. Jr., Casadevall A., Rodríguez G.M.: Role for *Mycobacterium tuberculosis* membrane vesicles in iron acquisition. *J. Bacteriol.*, 2014; 196: 1250-1256
- [85] Pritsch M., Ben-Khaled N., Chaloupka M., Kobold S., Berens-Riha N., Peter A., Liegl G., Schubert S., Hoelscher M., Löscher T., Wieser A.: Comparison of intranasal outer membrane vesicles with Cholera toxin and injected MF59C.1 as adjuvants for malaria transmission blocking antigens AnAPN1 and Pfs48/45. *J. Immunol. Res.*, 2016; 2016: 3576028
- [86] Rakoff-Nahoum S., Coyne M.J., Comstock L.E.: An ecological network of polysaccharide utilization among human intestinal symbionts. *Curr. Biol.*, 2014; 24: 40-49
- [87] Rao P.K., Rodríguez G.M., Smith I., Li Q.: Protein dynamics in iron-starved *Mycobacterium tuberculosis* revealed by turnover and abundance measurement using hybrid-linear ion trap-Fourier transform mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2008; 80: 6860-6869
- [88] Rath P., Huang C., Wang T., Wang T., Li H., Prados-Rosales R., Elemento O., Casadevall A., Nathan C.F.: Genetic regulation of vesiculogenesis and immunomodulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: 4790-4797
- [89] Ratledge C., Patel P.V., Mundy J.: Iron transport in *Mycobacterium smegmatis*: The location of mycobactin by electron microscopy. *J. Gen. Microbiol.*, 1982; 128: 1559-1565
- [90] Renelli M., Matias V., Lo R.Y., Beveridge T.J.: DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, 2004; 150: 2161-2169
- [91] Resch U., Tsatsaronis J.A., Le Rhun A., Stübiger G., Rohde M., Kasvandik S., Holzmeister S., Tinnefeld P., Wai S.N., Charpentier E.: A two-component regulatory system impacts extracellular membrane-derived vesicle production in group A *Streptococcus*. *mBio*, 2016; 7: e00207-16
- [92] Rivera J., Cordero R.J., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A.: *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 19002-19007
- [93] Rodríguez G.M., Prados-Rosales R.: Functions and importance of mycobacterial extracellular vesicles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016; 100: 3887-3892
- [94] Rodríguez G.M., Smith I.: Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: Role in physiology and virulence. *Mol. Microbiol.*, 2003; 47: 1485-1494
- [95] Roier S., Zingl F.G., Cakar F., Durakovic S., Kohl P., Eichmann T.O., Klug L., Gadermaier B., Weinzerl K., Prassl R., Lass A., Daum G., Reidl J., Feldman M.F., Schild S.: A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nat. Commun.*, 2016; 7: 10515
- [96] Rothfield L., Pearlman-Kothencz M.: Synthesis and assembly of bacterial membrane components: A lipopolysaccharide-phospholipid-protein complex excreted by living bacteria. *J. Mol. Biol.*, 1969; 44: 477-492

- [97] 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.*, 2011; 55: 3084–3090
- [98] Sander L.E., Davis M.J., Boekschoten M.V., Amsen D., Dascher C.C., Ryffel B., Swanson J.A., Müller M., Blander J.M.: Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature*, 2011; 474: 385–389
- [99] Schooling S.R., Beveridge T.J.: Membrane vesicles: An overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.*, 2006; 188: 5945–5957
- [100] Schrepf H., Koesch I., Walter S., Engelhardt H., Meschke H.: Extracellular *Streptomyces* vesicles: Amphorae for survival and defence. *Microb. Biotechnol.*, 2011; 4: 286–299
- [101] Seitz P., Pezeshgi Modarres H., Borgeaud S., Bulushev R.D., Steinbock L.J., Radenovic A., Dal Peraro M., Blokesch M.: ComEA is essential for the transfer of external DNA into the periplasm in naturally transformable *Vibrio cholerae* cells. *PLoS Genet.*, 2014; 10: e1004066
- [102] Singh U., Grenier D., McBride B.C.: *Bacteroides gingivalis* vesicles mediate attachment of streptococci to serum-coated hydroxyapatite. *Oral Microbiol. Immunol.*, 1989; 4: 199–203
- [103] Smith S.G., Mahon V., Lambert M.A., Fagan R.P.: A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007; 273: 1–11
- [104] Solanki K.S., Pal D., Kaur G., Kumar P., Sahoo M., Chaudhuri P.: Isolation and characterization of OMPs and OMVs of *Brucella abortus* S19 and *Brucella abortus* S19Δper. *J. Pure Appl. Microbiol.*, 2016; 10: 2121–2126
- [105] Tashiro Y., Inagaki A., Shimizu M., Ichikawa S., Takaya N., Nakajima-Kambe T., Uchiyama H., Nomura N.: Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011; 75: 605–607
- [106] Tashiro Y., Yawata Y., Toyofuku M., Uchiyama H., Nomura N.: Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *Microbes Environ.*, 2013; 28: 13–24
- [107] Todorova D., Simoncini S., Lacroix R., Sabatier F., Dignat-George F.: Extracellular vesicles in angiogenesis. *Circ. Res.*, 2017; 120: 1658–1673
- [108] Toyofuku M., Cárcamo-Oyarce G., Yamamoto T., Eisenstein F., Hsiao C.C., Kurosawa M., Gademann K., Pilhofer M., Nomura N., Eberl L.: Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. *Nat. Commun.*, 2017; 8: 481
- [109] Toyofuku M., Nomura N., Eberl L.: Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2019; 17: 13–24
- [110] Toyofuku M., Tashiro Y., Nomura N., Eberl L.: Functions of MVs in Inter-Bacterial Communication. W: *Bacterial Membrane Vesicles. Biogenesis, Function and Applications*, red.: M. Kaparakis-Liaskos, T.A. Kufer, Springer, Cham, Szwajcaria 2020, 101–117
- [111] Tsatsaronis J.A., Franch-Arroyo S., Resch U., Charpentier E.: Extracellular vesicle RNA: A universal mediator of microbial communication? *Trends Microbiol.*, 2018; 26: 401–410
- [112] Tzipilevich E., Habusha M., Ben-Yehuda S.: Acquisition of phage sensitivity by bacteria through exchange of phage receptors. *Cell*, 2017; 168: 186–199.e12
- [113] Valguarnera E., Scott N.E., Azimzadeh P., Feldman M.F.: Surface exposure and packing of lipoproteins into outer membrane vesicles are coupled processes in *Bacteroides*. *mSphere*, 2018; 3: e00559-18
- [114] Vallejo M.C., Nakayasu E.S., Longo L.V.G., Ganiko L., Lopes F.G., Matsuo A.L., Almeida I.C., Puccia R.: Correction: Lipidomic analysis of extracellular vesicles from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One*, 2012; 7: e39463
- [115] Wang S., Gao J., Wang Z.: Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2019; 11: e1523
- [116] 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.*, 2000; 66: 4414–4420
- [117] 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.*, 2009; 9: 197

---

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.