

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Anna Benešová

Membránové měchýřky u bakterií a jejich úloha v rezistenci k antibiotikům
Membrane vesicles in bacteria and their role in antibiotic resistance

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

Praha, 2021

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Ivu Konopáskovi, CSc. za odborné vedení, cenné připomínky a čas, který mi při psaní této bakalářské práce věnoval.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

6.5.2021

Podpis

Abstrakt

Membránové měchýřky jsou produkovány grampozitivními i gramnegativními bakteriemi. Mechanismus jejich vzniku se mezi těmito skupinami bakterií liší. Je to způsobeno odlišnou stavbou jejich buněčné stěny. Gramnegativní bakterie obsahují vnější membránu, ze které se mohou měchýřky uvolňovat. U grampozitivních bakterií jsou měchýřky odvozené z cytoplazmatické membrány a musí překonat bariéru v podobě silné vrstvy peptidoglykanu. Měchýřky obsahují buněčné komponenty, jejichž vlastnosti umožňují měchýřkům plnit různé funkce. Mezi tyto funkce patří i rezistence proti antibiotikům. Tato práce pojednává o třech způsobech, kterými měchýřky chrání buňky před antibiotiky: transport enzymů degradujících antibiotika, vychytávání antibiotik z prostředí buňky a roli měchýřků v horizontálním genovém přenosu.

Abstract

Membrane vesicles are produced by both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Mechanism of their formation differs between these two groups of bacteria. It is caused by the different structure of their cell envelope. Gram-negative bacteria contain outer membrane and membrane vesicles can originate from this membrane. Membrane vesicles of Gram-positive bacteria are derived from the cytoplasmic membrane. They have to cross the barrier of the thick layer of peptidoglycan. Membrane vesicles contain cellular components whose properties enable vesicles to fulfil various functions. Antibiotic resistance can be counted as one of these functions. This thesis discusses three ways used by the membrane vesicles to protect the cells from antibiotics: transport of enzymes that degrade antibiotics, removal of antibiotics from cell's surroundings and role of membrane vesicles in horizontal gene transfer.

Klíčová slova

membránové měchýřky, grampozitivní bakterie, gramnegativní bakterie, antibiotiková rezistence

Key words

membrane vesicles, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, antibiotic resistance

Seznam zkratek

| | | |
|------|--|---|
| ABC | ATP Binding Cassette | ATP vazebná kazeta |
| CMV | cytoplasmic membrane vesicle | měchýřek odvozený z cytoplazmatické membrány |
| CPM | cytoplasmic membrane | cytoplazmatická membrána |
| DNA | deoxyribonucleic acid | deoxyribonukleová kyselina |
| ECM | extracellular matrix | extracelulární matrix |
| ETEC | enterotoxigenic <i>E. coli</i> | enterotoxigenní <i>E. coli</i> |
| EV | extracellular vesicle | extracelulární měchýřek |
| G- | Gram-negative | gramnegativní |
| G+ | Gram-positive | grampozitivní |
| GSP | General Secretory Pathway | obecná sekretorická dráha |
| HGT | horizontal gene transfer | horizontální přenos genů |
| IgG | immunoglobulin G | imunoglobulin G |
| IL | interleukin | interleukin |
| IM | inner membrane | vnitřní (cytoplazmatická) membrána |
| InlB | internalin B | internalin B |
| IOMV | inner and outer membrane vesicle | měchýřek s cytoplazmatickou a vnější membránou |
| Lpp | Braun's lipoprotein | Braunův lipoprotein |
| LPS | lipopolysaccharide | lipopolysacharid |
| MCE | mammalian cell entry | vstup do savčí buňky |
| MIC | minimum inhibitory concentration | minimální inhibiční koncentrace |
| Mla | maintenance of outer membrane lipid asymmetry | zachování asymetrie vnější membrány |
| MV | membrane vesicle | membránový měchýřek |
| OIMV | outer-inner membrane vesicle | měchýřek s cytoplazmatickou a vnější membránou |
| OM | outer membrane | vnější membrána |
| OmpA | outer-membrane protein A | protein vnější membrány A |
| OMPs | outer membrane proteins | proteiny vnější membrány |
| OMV | outer membrane vesicle | měchýřek z vnější membrány |

| | | |
|-------------|---|---|
| PBPs | penicillin-binding proteins | penicilin vazebné proteiny |
| PQS | <i>Pseudomonas</i> quinolone signal | chinolonový signál <i>Pseudomonas</i> |
| QRDR | quinolone-resistance-determining region | oblast stojící za rezistencí k chinolonům |
| RNA | ribonucleic acid | ribonukleová kyselina |
| sRNA | short RNA | malá nekódující RNA |
| TLR | toll-like receptor | receptor podobný <i>toll</i> |
| TNF | tumor necrosis factor | faktor nádorové nekrózy |
| tRNA | transfer RNA | transferová RNA |
| <i>virR</i> | vesiculogenesis and immune response regulator | regulátor tvorby měchýřků a imunitní odpovědi |
| wt | wild-type | divoký |

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Úvod..... | 1 |
| 2. Historie studia membránových měchýřků u G+ a G- bakterií..... | 2 |
| 3. Typy membránových měchýřků u G- bakterií, mechanismus jejich vzniku a jejich obsah..... | 2 |
| 3.1. Měchýřky uvolněné z vnější membrány (OMV)..... | 3 |
| 3.2. Jiné typy membránových měchýřků G- bakterií | 8 |
| 4. Typy membránových měchýřků u G+ bakterií, mechanismus jejich vzniku a jejich obsah | 11 |
| 4.1. Membránové měchýřky G+ bakterií s „klasickou“ buněčnou stěnou | 11 |
| 4.2. Membránové měchýřky G+ bakterií – mykobakterie a mykoplasmy | 15 |
| 5. Membránové měchýřky v rezistenci proti antibiotikům..... | 16 |
| 5.1. Gramnegativní bakterie | 17 |
| 5.1.1. Transport enzymů inaktivujících antibiotika..... | 17 |
| 5.1.1.1 β -laktamáza | 17 |
| 5.1.1.2 Jak se β -laktamáza do měchýřku dostává?..... | 17 |
| 5.1.1.3 Kde se β -laktamáza v měchýřku nachází?..... | 18 |
| 5.1.1.4 Jak se antibiotikum k β -laktamáze dostává? | 19 |
| 5.1.1.5 Transport dalších enzymů inaktivujících antibiotika..... | 20 |
| 5.1.2. Odstranění antibiotik z extracelulárního prostoru | 21 |
| 5.1.3. Váčky jako vektor v horizontálním genovém přenosu..... | 23 |
| 5.2. Grampozitivní bakterie..... | 24 |
| 5.2.1. Transport β -laktamázy..... | 24 |
| 5.2.2. Odstranění antibiotik z extracelulárního prostoru | 25 |
| 5.2.3. Váčky jako vektor v horizontálním genovém přenosu..... | 26 |
| 6. Závěr..... | 27 |
| 7. Seznam použité literatury | 29 |

1. Úvod

Membránové měchýřky jsou produkovány buňkami domén *Bacteria*, *Archaea* i *Eukarya*. U *Bacteria* (dále jako „bakterie“) jsou pozorovány od 60. let minulého století, kdy byly objeveny u gramnegativních bakterií. U grampozitivních bakterií jsou zkoumány až od 90. let. První část této bakalářské práce shrnuje v současnosti známé mechanismy, kterými jsou váčky uvolňovány do prostředí. Nejlépe prostudovanými měchýřky (váčky) jsou tzv. outer membrane vesicles (OMV), což jsou útvary odvozené od vnější membrány gramnegativních (G-) bakterií. Popsán bude jejich vznik v důsledku oslabení propojení buněčné stěny, změn ve složení vnější membrány, interkalace signální molekuly PQS (*Pseudomonas* quinolone signal) do vnější membrány a hromadění nesprávně sbalených proteinů v periplazmě. OMV nejsou pouhé fragmenty membrány. Tyto váčky slouží k exportu různých molekul z buňky, kdy se nejedná pouze o periplazmatické komponenty či komponenty vnější membrány – OMV mohou obsahovat i cytoplazmatické proteiny či nukleové kyseliny. Kromě OMV mohou gramnegativní bakterie vylučovat i jiné typy membránových měchýřků, které budou také zmíněny. Membránové měchýřky grampozitivních (G+) bakterií nejsou tak dobře prostudované, přesto i u nich je známo více typů měchýřků a mechanismů jejich vzniku. Jejich obsah souvisí se způsobem jejich vzniku a bude zmíněn vždy u konkrétního typu měchýřků. Ke grampozitivním bakteriím patří i bakterie s netypickou stavbou buněčné stěny – mykobakterie a mykoplasmy. Váčky vylučované těmito bakteriemi budou probrány v samostatné části.

Rezistence patogenních bakterií proti antibiotikům je v současné době celosvětově narůstajícím problémem. Jedním z prostředků rezistence jsou i membránové měchýřky. Jsou schopné ochránit živé bakteriální buňky před působením antibiotik i antimikrobiálních peptidů. Nejčastěji zmiňovaným prostředkem je transport enzymu β -laktamázy, který degraduje β -laktamová antibiotika. Může se jednat o protein ve váčcích, nebo o DNA s genem kódujícím β -laktamázu. Z toho vyplývá, že váčky mohou být považovány za alternativní způsob horizontálního genového přenosu. Měchýřky samotné mohou chránit bakterie i pouhou přítomností v extracelulárním prostředí, kde mohou sloužit například k odstranění antimikrobiálních peptidů z okolí buněk. Antimikrobiální peptidy se vážou na membránu měchýřků místo vazby na membrány bakteriálních buněk. Tím jsou před nimi bakteriální buňky chráněny.

Tato bakalářská práce si klade za cíl shrnout způsoby, kterými membránové měchýřky grampozitivních a gramnegativních bakterií přispívají k rezistenci bakterií proti antibiotikům.

Rezistence proti antibiotikům je jedna z funkcí, kterou mohou váčky plnit na základě vlastností nákladu, který nesou.

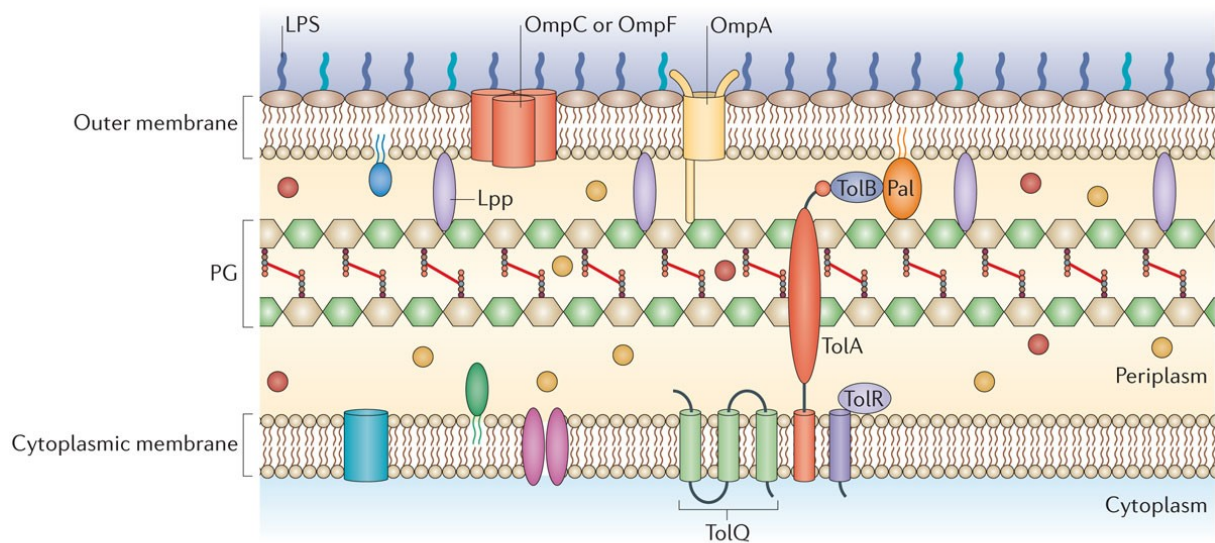
2. Historie studia membránových měchýřků u G+ a G- bakterií

Membránové měchýřky a vezikulární transport jsou známé u eukaryotních buněk, kde je dosud známo více mechanismů, jak tyto membránové útvary vznikají. Slouží zejména k přesunu materiálu uvnitř buňky mezi buněčnými kompartmenty. U bakterií obecně chybí membránou oddělené kompartmenty, mezi kterými by váčkový transport probíhal. Váčky zde směřují do vnějšího prostředí. Zpočátku nebylo jasné, jak vznikají, pokud jsou bakterie vybaveny pevnou buněčnou stěnou. Vůbec poprvé byly měchýřky pozorovány už v 60. letech 20. století u *Vibrio cholerae* (S. N. Chatterjee & Das, 1967) či u *Escherichia coli* (Work et al., 1966). Obě tyto bakterie jsou gramnegativní a měchýřky, které u nich byly v 60. letech pozorovány, se označují jako OMV (z anglického **outer membrane vesicles**). Už z názvu je patrné, že se jedná o měchýřky pocházející z vnější membrány. Existence měchýřků grampozitivních bakterií byla poprvé zmiňována až v 90. letech 20. století (Dorward & Garon, 1990). Jejich produkce se mohla zdát překvapivá, protože jejich vzniku zde brání vrstva peptidoglykanu. Výskyt membránových měchýřků u grampozitivních bakterií ukazuje, že musí existovat více mechanismů vzniku těchto útvarů kromě pouhého oddělování částí vnější membrány u gramnegativních bakterií. S mechanismem vzniku potom souvisí kromě struktury vzniklého váčku také jeho obsah. Druh, původ a obsah membránových měchýřků bakterií je v posledních letech tématem mnoha přehledových článků (Nagakubo et al., 2020; Schwechheimer & Kuehn, 2015; Toyofuku et al., 2019).

3. Typy membránových měchýřků u G- bakterií, mechanismus jejich vzniku a jejich obsah

Vnější membrána gramnegativních bakterií má specifické složení. Vnější polovrstva se skládá z lipopolysacharidu (tzv. LPS). Vnitřní polovrstva je naopak složená především z glycerofosfolipidů. Spojení vnější membrány s peptidoglykanem je zajištěno hlavně následujícími třemi způsoby: 1) kovalentní vazba C-konce Braunova lipoproteinu (Lpp) do peptidoglykanové vrstvy a zároveň jeho interakce s lipidickou částí vnější membrány, 2) nekovalentní interakce některých proteinů vnější membrány (zvláště outer-membrane protein A – OmpA) s peptidoglykanem, 3) propojení všech tří komponent buněčné stěny (vnější

membrány, periplazmatického prostoru s peptidoglykanem a cytoplazmatické membrány) proteinovým komplexem Tol-Pal v některých částech buňky (Obrázek 1).



Nature Reviews | Microbiology

Obrázek 1: Buněčná stěna G- bakterií | Buněčná stěna se nachází nad cytoplazmatickou membránou a zahrnuje periplazmatický prostor, který obsahuje vrstvu peptidoglykanu (PG), a vnější membránu, která se skládá z fosfolipidů (vnitřní list) a lipopolysacharidu (LPS; vnější list). V buněčné stěně se nachází periplazmatické proteiny, zatímco v membránách se nachází transmembránové proteiny či jsou s nimi asociované proteiny s kovalentně připojenými lipidickými zbytky (lipoproteiny). Stabilitu membrány zajišťují četná propojení: pomocí Braunova lipoproteinu (Lpp), porinu A vnější membrány (OmpA) a komplexu Tol-Pal (proteiny TolA, TolB, TolQ, TolR, lipoprotein Pal).

Převzato z Schwechheimer & Kuehn, (2015).

3.1. Měchýřky uvolněné z vnější membrány (OMV)

Oslabením výše zmíněného propojení dochází k samovolnému odštěpení váčku, který je ohraničený membránou, která je stejně jako vnější membrána tvořená LPS a glycerofosfolipidy. K oslabení propojení komponent buněčné stěny a odštěpování měchýřků dochází přirozeně ve „wild-type“¹ kmenech gramnegativních bakterií při remodelaci buněčné stěny (štěpení stávajícího peptidoglykanu a inzerci peptidoglykanových podjednotek) a krátkodobému oslabení propojení komponent buněčné stěny v důsledku růstu buněk či dělení v místech, kde dochází k tvorbě septa (Deatherage et al., 2009). U kmenů, kde jsou mutacemi postižena propojení mezi peptidoglykanem a vnější membránou, dochází ke zvýšené tvorbě membránových měchýřků. U *Salmonella typhimurium* byla zjištěna větší produkce membránových váčků u kmenů mutantních v genu pro OmpA či lipoprotein – Lpp (Deatherage et al., 2009). U kmene mutantního v Lpp bylo dále zjištěno, že po expresi kompletního Lpp

¹ „wild-type“ ve smyslu výchozí kmen bez zavedených mutací (dále používána zkratka wt)

z plazmidu (i s C-terminálním lysinem) v tomto kmeni došlo ke komplementaci. Oproti tomu po expresi Lpp, jemuž chybí C-terminální lysin odpovídající za kovalentní interakci s peptidoglykanem, nedošlo k obnově propojení vnější membrány a peptidoglykanu a pokračovala zvýšená produkce měchýřků. U *Escherichia coli* byly studovány mutace v každém z genů Tol-Pal komplexu. Mutace v jakémkoliv z těchto genů vedla k tvorbě měchýřků. Vysoká míra produkce OMV byla detekována u mutantních kmenů *tolA*, *tolQ* a *tolR* oproti nízké produkci u kmenů *tolB* a *pal*. Změna v komplexu TolAQR má zřejmě na tvorbu měchýřků větší vliv (Bernadac et al., 1998). Z výsledků vyplývá, že mutace postihující propojení peptidoglykanu a vnější membrány vedou k pasivnímu uvolnění vnější membrány od peptidoglykanu, jejímu „vyboulení“ a oddělení váčku (Obrázek 4).

Vliv na tvorbu váčků může mít dále fosfolipidové složení membrány a akumulace fosfolipidů ve vnějším listu vnější membrány. Vnější membrána je typická svou asymetrií, kdy se vnitřní polovrstva skládá z glycerofosfolipidů a vnější polovrstva z LPS. Tato asymetrie byla experimentálně dokázána v 70. letech 20. století (Kamio & Nikaido, 1976). Jakým způsobem jsou fosfolipidy transportovány periplazmou a jakým způsobem je udržována asymetrie, zůstává dlouho neobjasněným problémem. Pro přesun fosfolipidů z vnější (OM) do cytoplazmatické membrány (CPM) byla u *E. coli* navržena role tzv. MCE (mammalian cell entry) proteinů tvořících transportní systémy (Ekiert et al., 2017). Teoreticky tyto proteinové systémy mohou pracovat i opačným směrem – tzn. také jako exportní systém fosfolipidů z CPM do OM. Význam exportu fosfolipidů z CPM do OM je jasný – fosfolipidy jsou zapotřebí jako materiál pro stavbu vnitřního listu OM. Význam transportu fosfolipidů z OM do CPM ale objasněný není (Shrivastava et al., 2017).

Mezi MCE proteiny patří i proteiny tvořící tzv. Mla dráhu (maintenance of outer membrane lipid asymmetry). U Mla dráhy, která patří mezi ABC transportní systémy (Hughes et al., 2019) existují důkazy, že je Mla dráha skutečně prostředkem retrográdního transportu z OM do CPM. Její role je zřejmě v odstraňování fosfolipidů, které by se ocitly ve vnějším listu OM (Malinverni & Silhavy, 2009). Mla dráha může být jeden ze způsobů, jak zabránit hromadění fosfolipidů ve vnějším listu OM. Fosfolipidy ve vnějším listu totiž porušují asymetrii dvojrstvy OM, čímž zároveň narušují její správné fungování.

Takové nahromadění fosfolipidů ve vnějším listu vnější membrány bylo sledováno u bakterií *Haemophilus influenzae* a *Vibrio cholerae* (Roier et al., 2016), respektive u jejich kmenů mutantních v genech pro ABC transportní systém VacJ/Yrb. VacJ a Yrb jsou homologní ke komponentám dráhy Mla. Mutace v genech pro tento transportní systém vede nakonec

k obohacení vnějšího listu vnější membrány o fosfolipidy. Asymetrické rozšíření vnějšího listu vede k „vyboulení“ vnější membrány a výsledkem je zvýšená tvorba OMV.

Na podobném principu funguje i tvorba membránových měchýřků u *Pseudomonas aeruginosa*. Tato gramnegativní bakterie produkuje malé quorum-sensing molekuly PQS (*Pseudomonas* quinolone signal). U PQS se předpokládá interkalace do vnějšího listu vnější membrány. Mechanismus exportu PQS z cytoplazmy není dosud objasněn. Pokud by se ale jednalo o aktivní sekreci na povrch buňky, mohla by molekula PQS přímo interkalovat do vnějšího listu vnější membrány díky vysoké afinitě PQS pro molekuly LPS (Mashburn-Warren et al., 2008). Interkalací vzniká nepoměr mezi plochou vnějšího a vnitřního listu, který vede k uvolnění OMV (Schertzer & Whiteley, 2012). PQS je rovněž schopen vyvázat dvojjazné ionty hořčíku a vápníku, které běžně stabilizují pomocí solných můstků záporné náboje fosfátů v LPS (Mashburn-Warren et al., 2008). Bez těchto solných můstků se projeví odpudivé síly mezi zápornými náboji molekul LPS. Tyto repulze vedou u gramnegativních bakterií ke zvýšené produkci membránových měchýřků (Obrázek 4). Nárůst produkce měchýřků byl sledován u *Escherichia coli* K12 po přidání PQS do kultury. K potlačení nárůstu produkce došlo poté dodáním nadbytku $MgCl_2$ (Tashiro et al., 2010), který opět stabilizoval záporné náboje fosfátů v LPS.

Uvolňování váčků je také jedním ze způsobů, kterým bakteriální buňky odpovídají na stres. Jedním ze stresorů může být hromadění denaturovaných proteinů v periplazmatickém prostoru. Nesbalené či nesprávně sbalené proteiny vnější membrány (OMPs) v periplazmě aktivují odpověď řízenou sigma faktorem σ^E (RpoE) vedoucí ke změně transkripce v odpovědi na stres (Walsh et al., 2003). Je známo, že pod kontrolou σ^E je exprese genů potřebných pro sbalení či degradaci denaturovaných extracytoplazmatických proteinů. Další funkcí σ^E je regulace transkripce malých RNA MicA a MicL, které regulují transkripci genů *ompA* (Udekwu et al., 2005, 2007) a *lpp* (Guo et al., 2014). Tato posttranskripční regulace vede ke snížené produkci OmpA a Lpp, tudíž se sníží i množství nesbalených forem těchto proteinů v periplazmě. Tato stresová odpověď je popsána v přehledovém článku autorů Grabowicz & Silhavy (2017). Podle přehledového článku Schwechheimer et al., (2013) může vést snížení množství OmpA a Lpp závislé na σ^E k tvorbě OMV na základě snížení počtu propojení mezi vnější membránou a peptidoglykanem.

Tvorba OMV může být ale považována i za komplementární nezávislou stresovou odpověď vzhledem k odpovědi řízené pomocí σ^E (McBroom & Kuehn, 2007). Zvýšená tvorba měchýřků byla pozorována u kmene *Escherichia coli* s mutantním genem *degP*. DegP je tzv. protein teplotního šoku (heat shock protein), který při nižších teplotách funguje jako

chaperon napomáhající správnému sbalení proteinů vnější membrány, zatímco při vyšších teplotách slouží téměř výhradně k jejich proteolýze (Spiess et al., 1999). Jeho exprese je řízena faktorem σ^E (Lipinska et al., 1988). Bylo navrženo, že kmen s nefunkčním DegP odstraňuje nesprávně sbalené proteiny z periplazmy pomocí OMV. Nesprávně sbalené proteiny se hromadí v periplazmě, čímž ji roztahují, až nakonec dojde k „vyboulení“ vnější membrány a uvolnění váčku (Obrázek 4).

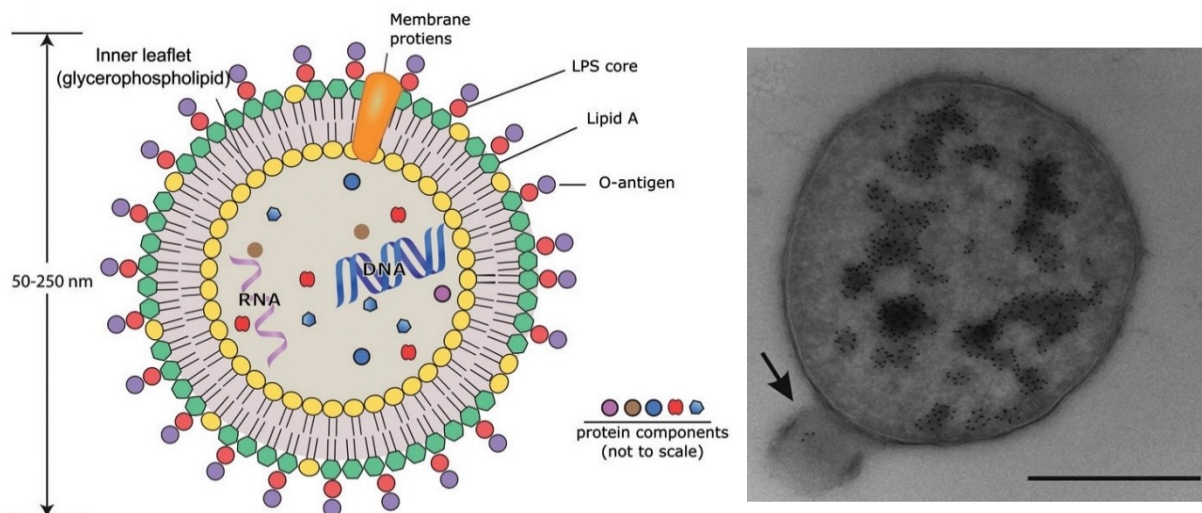
Paralelně s nesbalenými proteiny mohou k vytvoření váčku přispívat i proteiny působící v periplazmě, jejichž exprese je řízena faktorem σ^E . Po aktivaci σ^E nesprávně sbalenými proteiny jsou tvořeny proteázy, jejichž proteolytická činnost produkuje další částice přispívající k roztažení periplazmy. Důležitá role OMV v odstraňování nesbalených proteinů byla dále podpořena dalšími studiemi na kmeni *Escherichia coli* s mutací v genu *degP* (Schwechheimer & Kuehn, 2013). Zde byla navíc zavedena mutace v genu pro lipoprotein vázaný do cytoplazmatické membrány NlpA (Yu et al., 1986), u kterého byla zjištěna role ve vytváření měchýřků ve stacionární fázi růstu. Bakterie mutantní v genu pro NlpA vykazují nižší produkci váčků. Tento kmen s dvojitou mutací zřejmě přišel o důležitý způsob, kterým by odstranil nesbalené proteiny z periplazmy – tvorbu OMV. Kmen mutantní v genech pro NlpA i DegP proto hromadil nesprávně sbalené proteiny v periplazmatickém prostoru ve stacionární fázi, což při vyšší teplotě vedlo k poruchám růstu.

OMV se mohou uvolňovat i z jiného druhu váčků, které byly pojmenovány jako IOMV – inner and outer membrane vesicles (Koning et al., 2013). Jedná se o typ váčku, který obsahuje vnitřní i vnější membránu gramnegativních bakterií (vznik takových struktur je popsán v kapitole 3.2.). U *Acinetobacter baumannii* bylo pozorováno uvolňování IOMV ve stacionární fázi růstu kultury. IOMV obsahovaly vnější membránu, vnitřní membránu i peptidoglykan. Bylo pozorováno oddělení vnější membrány ve formě OMV přímo z tohoto vícevrstevného váčku (Koning et al., 2013).

OMV díky svému původu přirozeně obsahují v membráně váčku proteiny vnější membrány (Lappann et al., 2013), lipopolysacharid (LPS), fosfolipidy a také část obsahu periplazmy, který se dovnitř dostává při jejich vzniku (Wai et al., 2003). Kromě toho ale mohou obsahovat i molekuly, které nejsou součástí vnější membrány či periplazmy – například DNA nebo RNA (Obrázek 2; vlevo).

U *Acinetobacter baylyi* byla prokázána přítomnost plazmidové DNA v OMV (Obrázek 2, vpravo). Plazmidová DNA byla značena pomocí protilátek označených částicemi zlata a byl sledován její přesun z cytoplazmy do OMV pomocí transmisní elektronové mikroskopie (Fulsundar et al., 2014). Plazmidová DNA je nejprve přesunuta do periplazmy, odkud se

do OMV dostává. Mechanismus přenosu DNA do periplazmy není popsán a není ani jasné, jestli je plazmidová DNA do OMV balena cíleně. U *Pseudomonas aeruginosa* byla zjištěna přítomnost chromosomální DNA uvnitř OMV. Tyto OMV *P. aeruginosa* potom byly dopravovány do eukaryotických buněk, což by mohlo poukazovat na existenci výměny genetického materiálu mezi bakteriemi a eukaryotními buňkami (Bitto et al., 2017). DNA se do měchýřků může dostávat také během tzv. explozivní lyze buněk (viz 3.2.). Ukázalo se, že může jít ale i o aktivní proces vylučování DNA v OMV dělicími se buňkami. Většina DNA asociovaná s OMV byla nalezena na povrchu váčků, ale část se nacházela také uvnitř. Určité geny byly uvnitř váčků zastoupeny ve větším počtu než ostatní, z čehož lze vyvodit, že DNA se dostává dovnitř OMV selektivním způsobem (Bitto et al., 2017). Bakterie tak cíleně balí do váčků určité úseky svého chromosomu. Autoři nevysvětlují, jak je možné, že se přitom v chromosomu zachovává úplná dědičná informace.

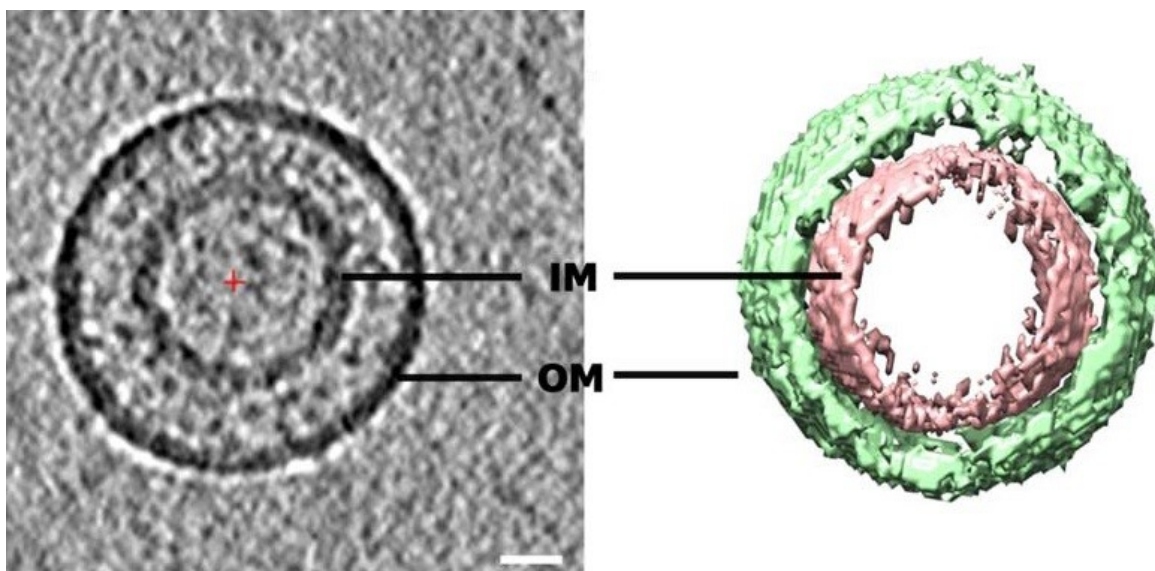


Obrázek 2: OMV a jeho obsah | Vlevo: Schématické zobrazení OMV. Membrána měchýřku zachovává asymetrii vnější membrány – vnitřní list: fosfolipidy; vnější list: LPS skládající se z lipidu A, LPS jádra (core) a O-antigenu. Obsah zahrnuje nukleové kyseliny, enzymy či toxiny. Upraveno, převzato z Anand & Chaudhuri, (2016). Vpravo: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu zobrazující DNA s navázanými protilátkami označenými částicemi zlata a buňku *A. baylyi*, která uvolňuje váček obsahující DNA (šipka). Měřítka vpravo dole – 500 nm. Upraveno, převzato z Fulsundar et al., (2014).

OMV mohou obsahovat i RNA, a to ve formě sRNA (short RNA, malá nekódující RNA). V *Pseudomonas aeruginosa* byla ukázána funkce regulační sRNA z OMV (tato regulační sRNA je fragmentem tRNA pro methionin) v regulaci imunitní odpovědi v kultuře lidských buněk epitelu dýchacích cest a myších plicích (Koeppen et al., 2016). OMV také mohou obsahovat cytosolické proteiny, jak bylo ukázáno při proteomické analýze vesikulů *Vibrio cholerae* (Altindis et al., 2014). Kromě pohlcení části periplazmy při vzniku váčku či

při odstraňování nesbalených proteinů periplazmy (viz výše) se mohou proteiny dostávat do OMV i selektivně, jako například u bakterií rodu *Bacteroides*, které jsou nejhojnějšími komenzálními (a příležitostně patogenními) bakteriemi lidského tlustého střeva (Elhenawy et al., 2014). *Bacteroides* do prostředí vylučují dosud nepopsanou drahou hydrolázy. U *Bacteroides fragilis* a *Bacteroides thetaiotaomicron* je velké množství hydroláz obsaženo v uvolňovaných OMV. Tyto hydrolázy jsou převážně kyselé povahy. Mohlo by jít o selekci pomocí náboje proteinů. Hydrolázy byly hlavně proteinázy a glykosidázy. Produkty jejich aktivity mohou sloužit jako živiny nejen bakteriím *Bacteroides*, ale i ostatním bakteriím, které s nimi sdílí prostředí. Tím *Bacteroides* a jejich OMV mohou pomáhat založení a udržení lidské mikrobioty.

3.2. Jiné typy membránových měchýřků G- bakterií



Obrázek 3: OIMV | Vlevo: Řez z kryoelektronové tomografické rekonstrukce OIMV *S. maltophilia* (tloušťka řezu: 52 nm). Vpravo: 3D model OIMV. Měřítko – 25 nm. IM: cytoplazmatická membrána, OM: vnější membrána.

Upraveno, převzato z Devos et al., (2017).

Jiným typem membránových měchýřků gramnegativních bakterií jsou měchýřky produkované činností autolysinu. Autolysiny tvoří skupinu endogenních enzymů, jejichž funkcí je štěpení vazeb v peptidoglykanu. Běžně se podílí na dělení buněk a obratu peptidoglykanu. Autolysiny a jejich schopnost degradovat peptidoglykan by mohly hrát roli v tvorbě měchýřků obsahujících cytoplazmatickou i vnější membránu, jak bylo ukázáno u *Pseudomonas aeruginosa* (Kadurugamuwa & Beveridge, 1995). Dočasné a lokalizované porušení peptidoglykanu autolysinem by umožňovalo „vyboulení“ cytoplazmatické membrány směrem ven vzniklým otvorem, kdy je vznikající měchýřek obalen ještě do vrstvy vnější membrány.

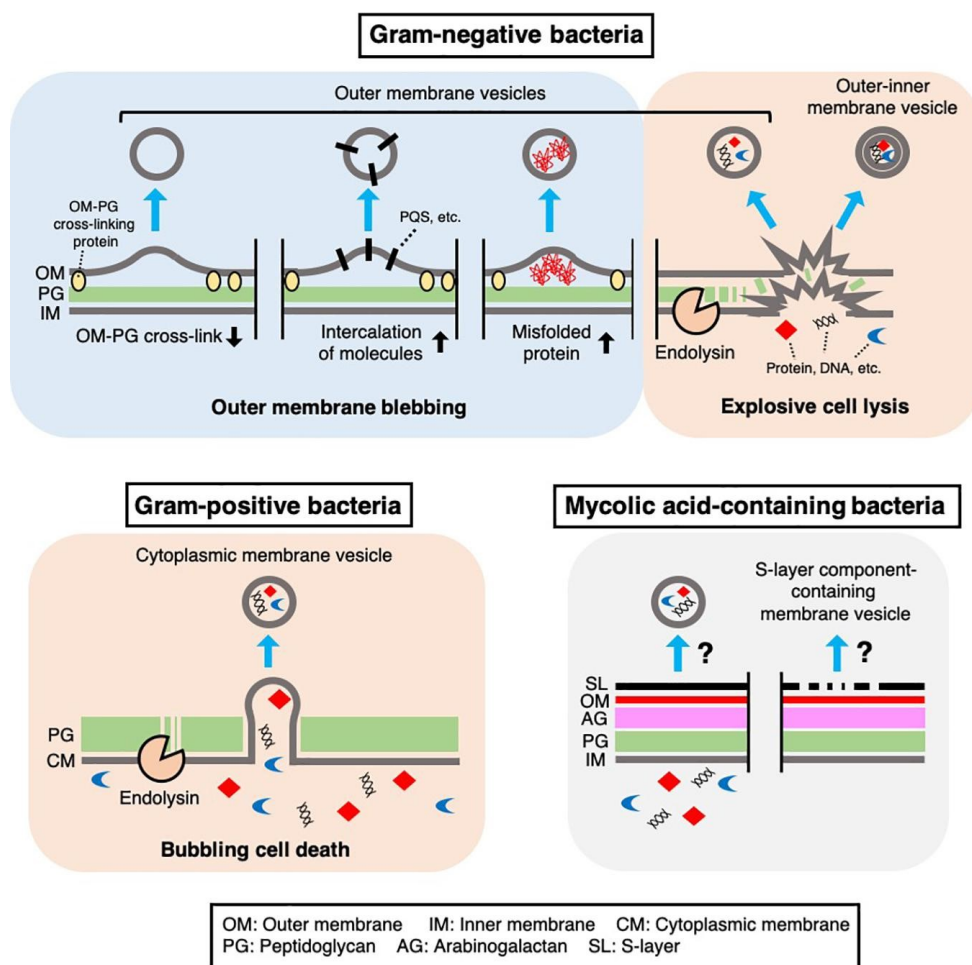
Vzniká tak váček obsahující obě membrány – cytoplazmatickou i vnější. Takovému typu váček se říká OIMV (z anglického outer-inner membrane vesicles). Zároveň by tím byl umožněný přístup cytoplazmatických molekul do uvolňovaného měchýřku, a to včetně DNA. Ta by potom mohla hrát roli v horizontálním genovém přenosu.

Vznik membránových měchýřků působením ciprofloxacinu (patří mezi chinolony, jejichž účinek je založený na inhibici DNA gyrázy, a tím inhibici superspiralizace DNA) byl ukázán u *Stenotrophomonas maltophilia* (Devos et al., 2017). Jde o oportunisticky patogenní bakterii, která se účastní tvorby biofilmů. V odpovědi na stres u ní dochází k tvorbě OMV, ale především ke tvorbě OIMV (Obrázek 3). OIMV byly velmi hojné u kultury vystavené ciprofloxacinu. Proteiny objevené v membránových měchýřcích naznačovaly, že v buňce probíhala SOS odpověď (odpověď na poškození DNA). Přestože zde není popsán mechanismus vzniku OIMV, je konstatováno, že by tento proces mohl souviset s SOS odpovědí indukovanou působením určitého typu antibiotika (zde chinolonového antibiotika ciprofloxacinu).

Působení ciprofloxacinu a vznik membránových měchýřků (autoři neuvádí, o jaký typ měchýřků se jednalo – jsou uváděny jako „membránové váčky“ – MV jako membrane vesicles) byl pozorován také u *Pseudomonas aeruginosa* (Turnbull et al., 2016). Mechanismem, kterým jsou v tomto případě vytvářeny membránové měchýřky, je tzv. explozivní lyze buněk (Obrázek 4). Jde o stresem indukovaný proces. Stres může být způsoben například růstem v anoxických podmínkách nebo vystavením biofilmu antibiotiku ciprofloxacinu. V rámci SOS odpovědi *Pseudomonas aeruginosa* na exogenní stres způsobující poškození DNA je zvýšena exprese klastru genů profága kódující také endolysin Lys. Endolysiny patří mezi enzymy, které hydrolyticky štěpí vazby v peptidoglykanu. Jsou kódovány bakteriofágy a účastní se posledního stádia lytického cyklu. V důsledku činnosti endolysinu buňky *Pseudomonas aeruginosa* nejprve změnil tvar z tyčinky na kulatou buňku a poté došlo k jejich explozi. Prasknutí buňky vedlo k vylití DNA a cytoplazmatických proteinů do prostředí biofilmu. Vzniklé fragmenty membrány se mohly znovu spojit a vytvořit váček, který do sebe uzavřel uvolněný obsah buňky včetně DNA. Explozivní lyze buněk je (vedle výše uvedeného selektivního balení DNA do váček) způsobem, kterým se DNA může do váček dostat.

Zvláštními membránovými strukturami souvisejícími s membránovými měchýřky jsou membránové výběžky propojující bakteriální buňky (někdy používán název nanotrubičky nebo nanovlákná). Tyto útvary byly objeveny u gramnegativní půdní bakterie *Myxococcus xanthus* (Remis et al., 2014). Byly pozorovány jako řetězky váček, periodicky zaškrčené trubičky i jako

prosté trubičky o šířce od 30 do 60 nm. Jedná se o struktury odvozené od vnější membrány. Ve větším množství jsou přítomné u bakterií rostoucích v biofilmu. Tvoří zde spoje mezi jednotlivými buňkami na úrovni periplazmatického prostoru, což by dle autorů mohl být prostředek výměny signálů (blíže nespecifikovaných) a živin. Jiná role nanotrubiček byla zkoumána u gramnegativní bakterie *Francisella novicida* (McCaig et al., 2013). Tato bakterie je příbuzná *Francisella tularensis*, která je známým původcem zoonotického onemocnění tularémie u lidí. *Francisella novicida* ale na rozdíl od *Francisella tularensis* vykazuje nízkou virulenci u člověka a je dobrým modelem pro laboratorní experimenty. Byla u ní objevena



Obrázek 4: Mechanismus vzniku membránových měchýřků | Gramnegativní bakterie: tvorba OMV a OIMV z vnější membrány či explozivní lyzí buněk. K uvolňování OMV z vnější membrány může docházet oslabením spojení vnější membrány a peptidoglykanu, interkalací molekul jako je PQS či hromaděním nesbalených proteinů v určitých oblastech buněčné stěny. Explozivní lýza buněk je způsobena endolysinem, který je kódovaný profágem a degraduje buněčnou stěnu. Grampozitivní bakterie: tzv. „bubbling cell death“, kdy endolysin kódovaný profágem degraduje buněčnou stěnu a cytoplazmatická membrána prochází otvory v peptidoglykanu. Bakterie obsahující v buněčné stěně mykolové kyseliny: mechanismus dosud neznámý. Bylo objeveno, že membránové měchýřky obsahují lipidy cytoplazmatické membrány či proteiny buněčné stěny jako například proteiny S-vrstvy. Převzato z Nagakubo et al., (2020)

regulovaná produkce nejen OMV, ale i trubičkových výběžků vnější membrány a jejich následné uvolnění v podobě podlouhlých váčků (OMV/T). V OMV/T byly identifikovány proteiny, které slouží jako virulenční faktory. Nanotrubičky zde na rozdíl od *Myxococcus xanthus* hrají roli v patogenezi, a nikoliv mezibuněčné komunikaci.

4. Typy membránových měchýřků u G+ bakterií, mechanismus jejich vzniku a jejich obsah

Buněčná stěna grampozitivních bakterií má odlišnou stavbu od gramnegativních bakterií. „Klasická“ buněčná stěna grampozitivních bakterií vypadá tak, že je nad cytoplazmatickou membránou uložena silná vrstva peptidoglykanu, teichoových kyselin kovalentně připojených k peptidoglykanu či lipidům cytoplazmatické membrány (tzv. lipoteichoové kyseliny). Některé grampozitivní aktinobakterie, mezi něž patří rody *Mycobacterium* či *Corynebacterium*, mají zvláštní stavbu buněčné stěny, která obsahuje kromě vrstvy peptidoglykanu i vnější membránu. Ta se skládá z arabinogalaktanu kovalentně připojeného k peptidoglykanu. Arabinogalaktan je navíc esterifikován mykolovými kyselinami (hydroxylované mastné kyseliny obsahující až 90 uhlíkových atomů) a na mykolové kyseliny se nekovalentně vážou lipidy (u mykobakterií glykolipidy a fosfolipidy), které tak tvoří vnější polovrstvu membrány. Nad touto vrstvou je ještě proteinová S-vrstva. Úplnou výjimkou je skupina bakterií *Tenericutes* (také známé jako mykoplasmy podle významného rodu *Mycoplasma*), které jsou obligátními intracelulárními patogeny. Tyto bakterie nemají buněčnou stěnu ani S-vrstvu a jejich cytoplazmatická membrána jako jediná mezi buňkami prokaryotní organizace obsahuje steroly.

Všechny tyto grampozitivní bakterie produkují membránové měchýřky, jak bude popsáno v následující části. Jak bylo zmíněno v úvodu kapitoly, u grampozitivních bakterií, které mají nad cytoplazmatickou membránou peptidoglykan, se jednalo o překvapivé zjištění. V posledních letech vyšly přehledové články zabývající se speciálně měchýřky grampozitivních bakterií – Brown et al. (2015) a Briaud & Carroll (2020).

4.1. Membránové měchýřky G+ bakterií s „klasickou“ buněčnou stěnou

První pozorování tvorby membránových měchýřků (MV jako membrane vesicles) bylo provedeno u *Staphylococcus aureus* (E. Y. Lee et al., 2009). Měchýřky měly průměr od 20 do 100 nm a byly obklopeny dvouvrstevnou membránou. Zároveň bylo identifikováno 90 proteinů obsažených v MV. Vzhledem ke specifickému profilu obsažených proteinů – profilu odlišného od cytoplazmy, cytoplazmatické membrány i buněčné stěny – bylo navrženo,

že musí existovat nějaký selekční mechanismus pro proteiny vylučované ve váčku. MV obsahovaly proteiny z cytoplazmy, cytoplazmatické membrány a extracelulární proteiny, na které byly zvláště bohaté. Mezi identifikovanými proteiny byly faktory rezistence proti antibiotikům (probráno níže v kapitole věnující se rezistenci), faktory virulence (jako toxiny či koagulázu) nebo proteiny, které přinášejí bakterii výhodu v boji s jinými bakteriemi. Zároveň byly v měchýřcích obsaženy proteiny, které se účastní biogeneze či degradace buněčné stěny: PBPs (penicillin-binding proteins), syntáza lipoteichoové kyseliny, N-acetylmuramoyl-L-alanin-amidáza Sle1 (hydroláza peptidoglykanu). Dále byl obsažen autolysin, který se, jak bylo popsáno výše, také účastní přestavby buněčné stěny. Přítomnost těchto enzymů by mohla přispívat k vytvoření váčku a jeho uvolnění rozvolněnou vrstvou peptidoglykanu.

Výše zmíněná úvaha o mechanismu pro výběr proteinů do měchýřků byla podpořena pozorováním produkce měchýřků a analýzou obsahu proteinů ve váčkách u grampozitivní *Listeria monocytogenes* (J. H. Lee et al., 2013). *Listeria monocytogenes* je lidským patogenem, který způsobuje onemocnění listeriózu. Do hostitele se dostává s kontaminovanou potravou, což znamená, že musí být schopná přežít v extrémních podmínkách trávicího traktu jako je nízké pH (Wiedmann et al., 1998) či vysoký osmotický tlak (Becker et al., 1998). K přežití v těchto stresujících podmínkách potřebuje bakterie transkripční faktor σ^B . V této studii kolektivu J. H. Lee et al. (2013) byla porovnávána produkce MV mezi wt kmenem a isogenním kmenem s mutovaným genem pro σ^B . Oba kmeny byly pěstovány *in vitro* v médiu až do stacionární fáze, kdy už jsou bakterie vystaveny stresovým podmínkám. Divoký kmen (wt) produkoval více měchýřků než mutantní kmen. Měchýřky wt kmene byly také bohatší na hlavní virulenční faktor internalin B (InlB) i na proteiny regulované σ^B oproti měchýřkům mutantního kmene. MV mutantního kmene měly také deformovaný tvar. To naznačuje, že σ^B hraje určitou roli v regulaci tvorby měchýřků a jejich proteinového „nákladu“. J. H. Lee et al. (2013) porovnávali množství produkovaných měchýřků na základě koncentrace proteinů. Jak ale poznamenává k této metodě přehledový článek autorů Brown et al. (2015), nedá se vyloučit, že mutantní kmen produkoval stejné množství měchýřků jako wt kmen, ale jednotlivé měchýřky byly chudší co do obsahu proteinů.

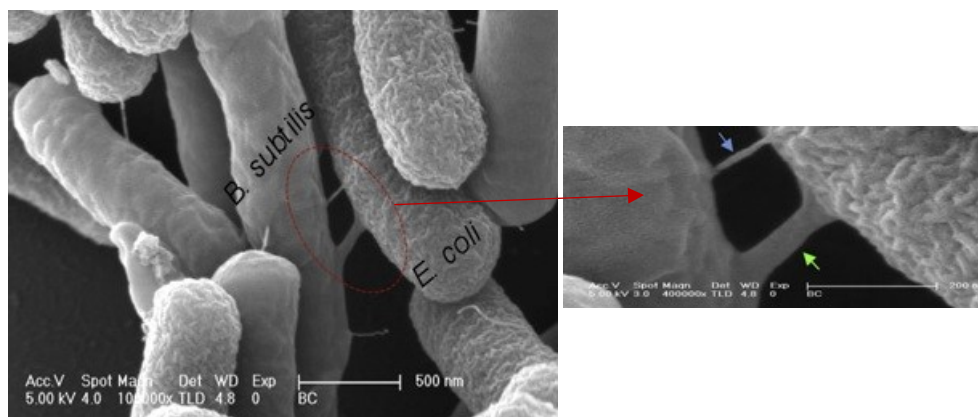
Jiným mechanismem překonání vrstvy peptidoglykanu při tvorbě membránových měchýřků je využití endolysinu kódovaného profágem u grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* (Toyofuku et al., 2017). Působení endolysinu a jeho vztah k tvorbě váčků byl popsán výše u gramnegativní *Pseudomonas aeruginosa*. Stejně jako u *Pseudomonas aeruginosa* dochází i zde pod vlivem stresu kvůli poškození DNA k expresi endolysinu defektního profága PBSX. Defektní profág není schopný dokončit replikační cyklus. Tvoří partikule, které místo

virového genomu obsahují fragmenty hostitelské DNA (Okamoto et al., 1968). Endolysin profága vytváří otvory v peptidoglykanu, ale u *Bacillus subtilis* na rozdíl od *P. aeruginosa* nedochází k explozi buňky. Místo toho se cytoplazmatická membrána „vyboulí“ skrz otvor v peptidoglykanu a vytvoří váček. Přestože zde nedochází k úplnému rozpadu buněčné stěny, většina buněk uvolňujících tímto způsobem váčky zahyne kvůli ztrátě integrity cytoplazmatické membrány. Mrtvé buňky poté uvolňují do prostředí endolysin, který může tentýž proces zopakovat u sousedních buněk. Toyofuku et al. (2019) nazývají tento způsob tvorby měchýřků „bubbling cell death“ (Obrázek 4). Toyofuku et al. (2017) testovali mutantní kmen *B. subtilis* v genu *recA* v přítomnosti mitomycinu C (DNA poškozující látka). Došlo k narušení produkce váček. RecA je jeden z hlavních regulátorů SOS systému, z čehož by mohlo vyplývat, že má tvorba váček působením endolysinu spojitost s SOS odpovědí (více popsáno níže).

Na endolysinu závislá tvorba měchýřků byla studována i u patogenní bakterie *Staphylococcus aureus* (Andreoni et al., 2019). Byla porovnáována produkce váček (označují se zde jako CMV od cytoplasmic membrane vesicles) u lysogenních kmenů (kmenů obsahujících profága kódujícího endolysin) a kmenů, které profága neobsahovaly. Ve standardních růstových podmínkách nebyl pozorován rozdíl mezi těmito kmeny, co se týká produkce CMV. Autoři se poté zaměřili na uvolňování CMV těmito kmeny po přidání následujících látek: mitomycinu C (látka poškozující DNA), ciprofloxacinu (antibiotikum viz výše) a β -laktamových antibiotik flukloxacilinu a ceftarolinu (antibiotika inhibující transpeptidaci při syntéze peptidoglykanu). Po přidání jakékoliv z těchto látek došlo v různé míře ke zvýšení produkce CMV, ale mechanismus vzniku CMV byl zřejmě odlišný. Mitomycin C a ciprofloxacin indukují SOS odpověď v důsledku poškození DNA, dále indukují expresi endolysinu a na endolysinu závislou produkci CMV pouze u lysogenních kmenů. Oproti tomu β -laktamová antibiotika způsobila po přidání desetinásobku MIC (minimální inhibiční koncentrace) zvýšení produkce CMV u všech kmenů tím, jak oslabují pevnost buněčné stěny. Bylo dokázáno, že váčky grampozitivních bakterií mohou obsahovat chromosomální DNA či extracelulární DNA (Jiang et al., 2014; S. Liao et al., 2014). U váček *Staphylococcus aureus* byl také stanovován obsah DNA ve váčkách, kdy větší množství DNA obsahovaly váčky vzniklé v závislosti na endolysinu po přidání mitomycinu C či ciprofloxacinu. Je to zřejmě důsledkem toho, že aktivace profága způsobí degradaci hostitelského chromosomu. Vznikající malé fragmenty DNA jsou potom snáze zabaleny do CMV.

Dalším typem membránových útvarů, který byl výše popsán u gramnegativních bakterií, ale vyskytuje se i u bakterií grampozitivních, jsou nanotrubičky. Jako modelový organismus pro jejich popis byl využit *Bacillus subtilis*. U bakterií rostoucích na pevném podkladu zde byly

popsány tenké trubičky spojující sousedící buňky a širší trubičky spojující vzdálenější buňky (Dubey & Ben-Yehuda, 2011). Složení trubiček ještě není zcela objasněné, nicméně se zřejmě jedná o vícevrstevné struktury složené z komponent buněčné stěny, cytoplazmatické membrány i cytoplazmy. V počáteční fázi zřejmě vznikají jako „vyboulení“ cytoplazmatické membrány přes otvor v peptidoglykanu. Byl pozorován přesun cytoplazmatického materiálu mezi buňkami pomocí těchto trubiček – proteinů, transkriptů genů či nekonjugativních plazmidů. Buňky zřejmě tímto způsobem mohou získávat nové vlastnosti včetně rezistence proti antibiotikům a tyto vlastnosti (v případě přenosu plazmidu) mohou být děděny vertikálně. Kromě výměny materiálu pomocí nanotrubiček mezi buňkami *Bacillus subtilis*, byla pozorována produkce těchto struktur a přesun materiálu i mezi *B. subtilis* a *Staphylococcus aureus*, a dokonce mezi *B. subtilis* a gramnegativní *Escherichia coli* (Obrázek 5). Mezi *B. subtilis* a *S. aureus* byly nanotrubičky morfologicky podobné nanotrubičkám mezi buňkami *B. subtilis*. Mezi *B. subtilis* a *E. coli* byly nanotrubičky tenčí, ale nejde o konjugaci. Autoři zdůrazňují, že je potřeba objasnit, zda se v případě nanotrubiček jedná o jednosměrný transport a zda tento přesun buněčných komponent vyžaduje energii. U *Bacillus subtilis* byla dále blíže studována struktura nanotrubiček (Dubey et al., 2016). Byla pozorována propojení mezi buňkami pomocí trubičkových struktur a v případě, že v okolí nebyly jiné buňky, byly vytvářeny dlouhé výběžky značně zvětšující buněčný povrch. Útvary jsou široké 40 až 60 nm. Nanotrubičky vznikají z cytoplazmatické membrány a prochází skrz peptidoglykan. Jejich průchod buněčnou stěnou zřejmě zajišťují proteiny typu PBPs či amidáz, které byly v nanotrubičkách identifikovány.



Obrázek 5: „Nanotrubičky“ mezi G+ a G- druhy bakterií | Vlevo: Skenovací elektronová mikroskopie – smíšená populace bakterií *E. coli* a *B. subtilis* (x100 000). Červený ovál označuje nanotrubičky mezi buňkami. Měřítko – 500 nm. Vpravo: Zvětšená oblast z červeného oválu (x400 000). Na základě textury – zelená šipka označuje silnou nanotrubičku vybíhající z *B. subtilis*, modrá šipka označuje tenčí nanotrubičku vybíhající z *E. coli*. Měřítko – 200 nm.
Upraveno, převzato z Dubey & Ben-Yehuda, (2011).

Tyto enzymy pak pomáhají se splynutím membránového výběžku s recipientní buňkou. Struktura těchto membránových útvarů se jeví jako periodicky zaškrcovaná trubička. Lumen trubičky je ale vždy nepřerušované. Zúžení není vždy úplně patrné, ale naproti tomu bylo někdy zúžení tak výrazné, že zřejmě docházelo k oddělování váčků z nanotrubiček.

4.2. Membránové měchýřky G+ bakterií – mykobakterie a mykoplasmy

Produkce membránových měchýřků byla objevena i u grampozitivních mykobakterií s vnější membránou (Obrázek 4). Váčky byly pozorovány u *Mycobacterium ulcerans* (Marsollier et al., 2007), což je patogenní mikroorganismus, který způsobuje u lidí nekrotizující onemocnění kůže – vřed nazývaný buruli. U morčat čistý mykolakton způsobil podobné léze, jaké se tvoří u lidí po infekci *Mycobacterium ulcerans* (George et al., 1999). Rezervoárem mykolaktonu se zdá být extracelulární matrix (tzv. ECM). Je to silná vrstva uhlovodíků, lipidů a proteinů. ECM je vylučována buňkami přichycenými k povrchu a postupně je obklopuje, až dojde k vytvoření biofilmu. Biofilm je struktura tvořená buňkami, které do svého okolí vylučují ECM. Tvorba biofilmu je důležitá pro patogenezu bakterií, protože biofilm je v tomto případě téměř nepropustný pro látky typu antibiotik a pevně přichycuje buňky k povrchu. Zde u *M. ulcerans* je netypicky ECM asociovaná pouze s vnější vrstvou bakteriálních buněk (ECM tady není tvořena všemi buňkami v biofilmu). U ECM byly objeveny asociované membránové váčky, které obsahovaly mykolakton a zřejmě stojí za zesílením jeho cytopatického efektu. Dále byla produkce membránových váčků objevena u více mykobakteriálních zástupců včetně klinicky významných mykobakterií *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium bovis* (Prados-Rosales et al., 2011). Membránové váčky (MV) o průměru 60 až 300 nm jsou zde aktivně uvolňovány a přispívají k virulenci patogenních bakterií. Obsahují totiž velké množství ligandů TLR2 jako lipoproteiny 19 kDa (Lpqh), LprA a LprG. Autoři na základě lipidového složení váčků předpokládají jejich původ v cytoplazmatické membráně. Dále byla zkoumána genetická podstata regulace uvolňování měchýřků u *Mycobacterium tuberculosis* (Rath et al., 2013). Byl identifikován gen *rv0431*, kterému byl díky jeho funkci přidělen název *virR* – „vesiculogenesis and immune response regulator“. Tento gen kóduje cytosolický protein, který je asociovaný s cytoplazmatickou membránou. Protein VirR dosud nedefinovaným mechanismem reguluje množství uvolňovaných měchýřků, které nesou ligandy TLR2 stimulující makrofágy. Jeho role je zřejmě v tlumení stimulace imunitního systému po bakteriální infekci, čímž zvyšuje virulenci *Mycobacterium tuberculosis*. K tlumení stimulace dochází snížením počtu uvolňovaných měchýřků nesoucích ligandy TLR2 (pod vlivem VirR se výrazně nemění průměrný obsah ligandů v jednom váčku).

Tenericutes (někdy označované i jako *Mollicutes* podle jediné třídy, kterou obsahují) jsou řazeny ke grampozitivním bakteriím i přes absenci buněčné stěny. Při tvorbě membránových váčků u nich měchýřek nemusí procházet vrstvou peptidoglykanu. Produkce membránových měchýřků byla nejprve pozorována u *Acholeplasma laidlawii* PG8 (Chernov et al., 2011). Tato mykoplasma často kontaminuje buněčné kultury. Byly objeveny struktury nazývané „ultramicroforms“ ve velikosti 70 až 90 nm a 110 až 120 nm (velikostně podobné měchýřkům grampozitivních a gramnegativních bakterií). Kromě velikosti se měchýřky nejspíše liší i obsahem a funkcí. Autoři došli k závěru, že se jedná o membránové váčky podobné váčkům z grampozitivních a gramnegativních bakterií, neboť „ultramicroforms“ měly kulovitý tvar a byly tvořeny dvojrstevnou membránou. Jejich obsah zahrnoval genetický materiál i proteiny. Zároveň byla prokázána existence membránových váčků i u jiné mykoplasmy – *Mycoplasma gallisepticum* S6. Význam těchto membránových váčků je ale potřeba ještě objasnit. Produkce měchýřků (zde jsou nazývány EV) byla dále studována u šesti klinicky významných zástupců rodu *Mycoplasma*: *M. mycoides* subsp. *mycoides*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. agalactiae*, *M. fermentans*, *M. bovis* (Gaurivaud et al., 2018). Jednotliví zástupci *Mycoplasma* spp. se lišili ve velikosti uvolňovaných měchýřků (30 až 220 nm) i jejich množství. Mechanismus jejich uvolňování bude ještě potřeba určit, ale ze stávajících poznatků autoři usuzují, že jde o „pučení“ váčků z cytoplazmatické membrány a mohlo by se jednat o aktivní proces. Byla zároveň provedena analýza proteinů asociovaných s membránou EV u tří z těchto šesti zástupců, kdy značnou část tvořily lipoproteiny, které se mohou účastnit interakce s hostitelskými buňkami a zánětlivých procesů. Lipoproteiny mykoplasmy jsou schopné spouštět produkci prozánětlivých cytokinů v monocytech – například IL-1 β , TNF- α nebo IL-6 (Rawadi & Roman-Roman, 1996). Pro analýzu solubilních proteinů a DNA či RNA ve váčcích bude třeba využít lepších purifikačních metod EV. Získání váčků u těchto bakterií je obtížné. Mykoplasmy jsou totiž velmi malé buňky (*M. mycoides* například tvoří řetízky buněk, kdy jedna buňka má průměr asi 500 nm) a určit velikostní hranici mezi buňkou a měchýřkem není jednoduché (Gaurivaud et al., 2018).

5. Membránové měchýřky v rezistenci proti antibiotikům

Rezistence proti antibiotikům je v současné době narůstajícím problémem v léčbě bakteriálních infekcí. Rezistence proti antibiotikům ale není jev, který by byl způsobený používáním antibiotik od jejich objevu ve 20. století. Antimikrobiální látky jsou přirozeně produkovány mikroorganismy pro boj s ostatními mikroorganismy v prostředí, což se netýká

pouze patogenních kmenů. Mikroorganismy si proto v průběhu evoluce vytvořily mechanismy rezistence, pomocí kterých se brání antimikrobiálními látkám svých konkurentů. Geny pro rezistenci proti antibiotikům mohou být velmi starého původu. Schopnost mikroorganismů získat rezistenci proti antibiotikům, na která byla původně citlivá je současný problém v boji s patogenními mikroorganismy. Používání antibiotik ve velkém měřítku (kromě medicíny mají antibiotika velký význam pro zemědělskou produkci) urychluje selekci kmenů, které jsou vůči antibiotikům rezistentní. Jedním z mechanismů, které mohou bakterie využít pro obranu proti antibiotikům a šíření rezistence jsou i membránové měchýřky, jak bude popsáno dále.

5.1. Gramnegativní bakterie

5.1.1. Transport enzymů inaktivujících antibiotika

5.1.1.1 β -laktamáza

Jedním z mechanismů rezistence proti antibiotikům je jejich inaktivace. Příkladem může být hydrolýza β -laktamového kruhu v β -laktamových antibiotikách bakteriálním enzymem – β -laktamázou. Nachází se v periplazmě některých gramnegativních bakterií, kde degraduje antibiotikum dříve, než se dostane ke svému cíli. Tímto cílem jsou PBPs – „penicillin-binding proteins“ (Ciofu et al., 2000). PBPs jsou membránové enzymy, které katalyzují děje v buněčné stěně. Konkrétně se účastní biosyntézy peptidoglykanu. Mezi jejich funkce patří začlenění prekurzorů do glykanového řetězce a propojení glykanových řetězců mezi sebou. β -laktamáza se díky své lokalizaci v periplazmě může dostávat do OMV. Její uvolňování pomocí OMV je výhodné, jak bude popsáno dále.

5.1.1.2 Jak se β -laktamáza do měchýřku dostává?

Acinetobacter baumannii je multirezistentní oportunistický patogen, který je častým původcem nozokomiálních infekcí. U kmene *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T byla provedena proteomická analýza OMV, která odhalila přítomnost β -laktamázy v OMV (Jin et al., 2011).

U *Acinetobacter baumannii* byla v OMV identifikována konkrétní β -laktamáza OXA-58 (Y. T. Liao et al., 2015). OXA-58 je β -laktamáza štěpící kromě penicilinů i imipenem (Poirel et al., 2005). Imipenem patří mezi karbapenemy, což je skupina β -laktamových antibiotik, která se používají zejména pro léčbu infekcí multirezistentními bakteriemi. Při studiu sekrece OXA-58 bylo prokázáno, že je tento protein primárně uvolňován z buňky pomocí OMV. Do OMV je balen selektivně po tom, co je transportován do periplazmy pomocí obecné sekretorické dráhy (GSP, General Secretary Pathway). Bez přítomnosti karbapenemu produkuje OMV s OXA-58 pouze kmen, který OXA-58 exprimuje v nadměrném množství.

Pomocí OMV odstraňuje hromadící se OXA-58 z periplazmy. Přítomnost karbapenemu způsobuje u *A. baumannii* zvýšení produkce OXA-58 asociovaného s váčky. Uvolňování β -laktamáz štěpících karbapenemová antibiotika do prostředí chrání nejen *Acinetobacter baumannii*, ale zároveň i jiné bakterie v rámci polymikrobiální infekce, které jinak nejsou vůči karbapenemu rezistentní (Y. T. Liao et al., 2014). Význam sekrece OXA-58 v OMV spočívá v ochraně tohoto proteinu před proteázami. Částečná degradace OXA-58 proteázou K naznačuje, že se část β -laktamázy nachází na povrchu OMV. Lokalizaci enzymu se věnuje další kapitola.

5.1.1.3 Kde se β -laktamáza v měchýřku nachází?

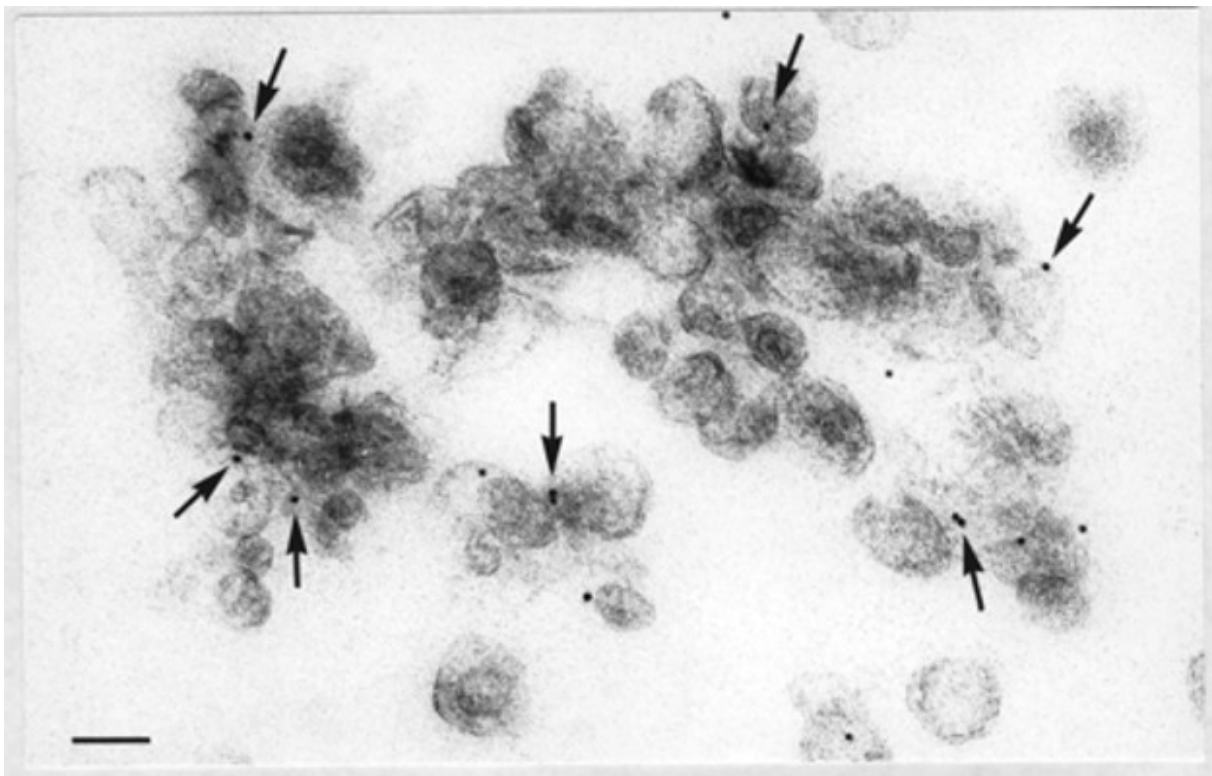
Funkce OMV je zřejmě v ochraně enzymu před degradací. Lokalizace enzymu byla studována u *Moraxella catarrhalis* (Schaar et al., 2011), gramnegativní bakterie, která je častým původcem onemocnění dýchacích cest u lidí. Stejně jako *Acinetobacter baumannii* uvolňuje OMV obsahující β -laktamázu. Její aktivita byla u *M. catarrhalis* zkoumána v souvislosti s β -laktamovým antibiotikem amoxicilinem. OMV obsahující β -laktamázu byly vystaveny působení proteázy K a bylo zjištěno, že si obsažená β -laktamáza zachovala svou enzymatickou aktivitu. Z toho vyplývá, že se všechny enzym nachází chráněný uvnitř OMV. Amoxicilin prochází membránou váčky a je uvnitř OMV degradován β -laktamázou. Váčky mohou ochránit před působením β -laktamového antibiotika citlivé kmeny *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*. OMV *Moraxella catarrhalis* zřejmě také chrání β -laktamázu před inhibicí specifickými protilátkami IgG, které byly nalezeny v séru 15 % zdravých dospělých (Schaar et al., 2013). Oproti výsledkům předchozí studie na *Moraxella catarrhalis* (Schaar et al., 2011) se β -laktamáza nacházela kromě lumen i na povrchu měchýřku. Protilátky IgG byly schopné rozpoznat OMV s β -laktamázou a vázat se na ně. β -laktamáza uvnitř měchýřků ale byla uchráněna před inhibicí protilátkou a enzymatická aktivita enzymu asociovaného s váčky byla do značné míry zachována.

Uvolňování β -laktamáz asociovaných s váčky byla kromě patogenních bakterií sledována i u komenzálních bakterií lidského střeva *Bacteroides* (Stentz et al., 2015). U *Bacteroides thetaiotaomicron* byla pozorována sekrece cefalosporinázy BtCepA (degraduje β -laktamová antibiotika cefalosporiny, zde konkrétně cefotaxim). Pokusy s proteázou K ukázaly, že β -laktamáza v tomto případě není v lumen váčky, ale na jeho povrchu. BtCepA ale zřejmě nemá žádnou transmembránovou doménu a zřejmě to není ani lipoprotein. BtCepA by se pravděpodobně mohla vázat na OMV pomocí elektrostatické interakce s fosfáty fosfolipidů. Umístění cefalosporinázy na povrch může být výhodné, neboť takto enzym pracuje efektivněji.

Transport cefalosporináz na povrchu OMV byl dále potvrzen i u dalších bakterií rodu *Bacteroides*. OMV *Bacteroides thetaiotaomicron* navíc zřejmě poskytují ochranu proti cefotaximu i jiným komenzálním bakteriím lidského střeva. OMV z *B. thetaiotaomicron* přidané ke kultuře *Bifidobacterium breve* dokázaly tyto bakterie ochránit před cefotaximem. To by mohlo mít význam v udržování rovnováhy střevní mikrobioty během léčby antibiotiky. Z druhé strany ale OMV obalené cefalosporinázou mohou chránit před účinkem cefotaximu i patogenní bakterie, například *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium (Stentz et al., 2015).

5.1.1.4 Jak se antibiotikum k β -laktamáze dostává?

První studie zabývající se sekrecí β -laktamázy u *Pseudomonas aeruginosa* ukázala přítomnost β -laktamázy v produkovaných OMV (Ciofu et al., 2000). Je zmíněna pravděpodobná lokalizace β -laktamázy v lumen měchýřku (Obrázek 6). Enzymatická aktivita β -laktamázy byla potvrzena pomocí nitrocefínu. Nitrocefín je cefalosporin (typ β -laktamového antibiotika), který je chromogenní (po hydrolýze β -laktamázou mění barvu). Nitrocefín zřejmě prošel dovnitř OMV skrz membránu až k β -laktamáze.



Obrázek 6: β -laktamáza v OMV | Tenký řez váčky *P. aeruginosa* obsahující β -laktamázu, s navázanými protilátkami značenými zlatem. Šipky ukazují na částice zlata. Měřítka vlevo dole – 100 nm.

Převzato z Ciofu et al., (2000).

Průchod antibiotik přes membránu OMV je zprostředkován poriny. OMV obohacené o poriny byly pozorovány u *Escherichia coli* RC85⁺ rezistentní proti β -laktamovým antibiotikům (Kim et al., 2018). Jejich množství v OMV bylo porovnáváno s OMV citlivého kmene RC85. Váčky rezistentní *Escherichia coli* dále obsahovaly méně TolC proteinu (kanál vnější membrány, který je součástí efluxních systémů pro antibiotika) a byly bohaté na β -laktamázu (zde uvažována její lokalizace uvnitř měchýřku). Díky porinům mohou OMV vychytávat β -laktamová antibiotika, čímž se sníží množství antibiotika, které dojde k samotné bakteriální buňce. Vzhledem k tomu, že OMV rezistentního kmene obsahovaly více než čtyřnásobné množství β -laktamázy oproti citlivé bakterii, mohlo tím dojít k navýšení efektivity činnosti tohoto enzymu. Měchýřky rezistentního kmene dokázaly ochránit před působením β -laktamových antibiotik (ampicilin, cefoperazon a cefotaxim) susceptibilní kmen. Zároveň byla testována schopnost ochránit bakterie *Salmonella* spp. a *Edwardsiella tarda* proti ampicilinu. V závislosti na dávce OMV přidávaných ke kulturám těchto bakterií byly OMV schopné *Salmonella* spp. a *Edwardsiella tarda* ochránit před ampicilem. OMV rezistentní *E. coli* zřejmě mohou před β -laktamovými antibiotiky ochránit populace jiných druhů bakterií, což by mohlo mít význam v léčbě polymikrobiálních infekcí.

5.1.1.5 Transport dalších enzymů inaktivujících antibiotika

U kmene *Escherichia coli* MG1655 byla pozorována ochranná funkce OMV proti antimikrobiálním peptidům působícím na membrány – kolistinu a melitinu (Kulkarni et al., 2015). Kolistin patří mezi kladně nabitě polymyxiny, které se vážou na LPS a tvoří pór v membráně. Melitin je peptid, který se skládá z 26 aminokyselin. Nejedná se o antibiotikum. Melitin je hlavní složka jedu včely medonosné (*Apis mellifera*) a jedná se o peptid schopný narušit biologické membrány tvorbou póru. OMV z *Escherichia coli* byly schopné ochránit před kolistinem a melitinem nejen vlastní kmen *Escherichia coli* MG1655, ale OMV ochránily i kultury *Acinetobacter radioresistens* a *Pseudomonas aeruginosa*, ke kterým byly OMV přidány. Bylo pozorováno, že kolistin a melitin zřejmě interagují s membránou OMV a rozrušují ji. Tím, jak se vážou do membrány OMV, se snižuje jejich množství v médiu. Dále bylo pozorováno, že melitin je uvnitř měchýřků degradován. Analýza proteomu váček objevila proteázy a peptidázy pocházející z vnější membrány, periplazmy a cytosolu (není vysvětleno, jak se cytosolické proteiny mohly dostat do OMV). Tyto enzymy asociované s OMV by mohly hrát roli v degradaci melitinu. Oproti tomu kolistin nebyl v membráně měchýřku degradován, za což by mohla být zodpovědná jeho struktura (je to cyklický peptid obsahující netypické aminokyseliny a acylový řetězec). Ukazuje se tedy, že OMV mohou nést i jiné enzymy

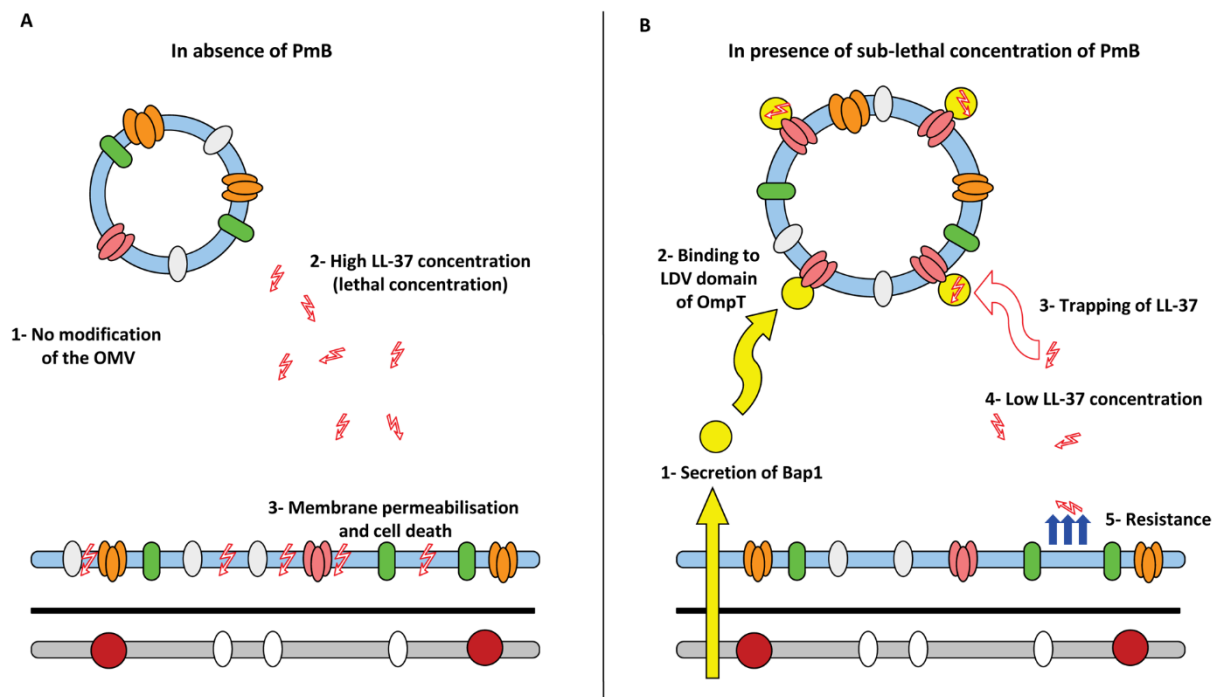
než β -laktamázu. V tomto případě se jednalo o proteázy a peptidázy, které degradovaly antimikrobiální peptid melitin. Zároveň je vidět potenciál váčků v roli „návnady“, kdy měchýřky odstraňují z média antimikrobiální peptidy, a tím snižují jejich koncentraci, jak bude popsáno dále.

5.1.2. Odstranění antibiotik z extracelulárního prostoru

Schopnost OMV ochránit bakterie před působením antimikrobiálních peptidů byla sledována u *Escherichia coli* ADA600 (Manning & Kuehn, 2011). Přidání purifikovaných OMV kmene ADA600 ke kultuře ADA600 zvýšilo frakci přeživších buněk v přítomnosti polymyxinu B a kolistinu. Váčky z kmene *E. coli* K12 a kmene *E. coli* ETEC (enterotoxigenní kmen) byly přidány ke kultuře ETEC v přítomnosti polymyxinu B. Váčky dokázaly zvýšit množství přeživších buněk u kmene ETEC. Polymyxin B zároveň způsobuje zvýšení produkce váčků u kmenů *E. coli* K12 a *E. coli* ETEC. Kmen ETEC-R, který je rezistentní vůči polymyxinu, má modifikovaný LPS, který neumožňuje vazbu tohoto antimikrobiálního peptidu (Tran et al., 2005). OMV ETEC-R kmene odvozené od vnější membrány s modifikovaným LPS by tudíž také neměly mít schopnost vázat polymyxin B, a tedy ani ochránit citlivý kmen ETEC před polymyxinem B. Tento předpoklad byl skutečně prokázán. K tomu, aby bakterie získala dlouhodobou rezistenci k polymyxinu potřebuje zvýšit expresi proteinů, které pozmění strukturu LPS (možný způsob zavedení této modifikace je uveden v dalším odstavci). K této dlouhodobé adaptaci u testovaného ETEC kmene nedošlo, pokud bylo ke kultuře přidáno velké množství váčků, které bakterie okamžitě ochránily před polymyxinem B. Autoři z výsledků usuzují, že ve skutečnosti váčky nejsou vytvářeny proto, aby poskytovaly bakteriím stoprocentní ochranu před polymyxinem B. Místo toho jsou tvořeny krátkodobě v odpovědi na nízké dávky polymyxinu B tak, aby měly některé buňky kultury šanci vybudovat si dlouhodobější rezistenci modifikací LPS. K tomu musí být hladina OMV dostatečně nízká, aby došlo ke stimulaci dlouhodobé rezistence volným polymyxinem B.

Adaptivní rezistence k antimikrobiálním peptidům by mohla být výsledkem aktivace dvoukomponentového systému subinhibičním množstvím antimikrobiálních peptidů. Dvoukomponentový systém se skládá z membránového senzoru, který přenáší signál na cytoplazmatický regulátor. Ten se potom váže na DNA a reguluje expresi genů. Takový dvoukomponentový systém, který je potřeba pro indukci adaptivní rezistence proti antimikrobiálním peptidům, byl popsán u *Pseudomonas aeruginosa* (Fernández et al., 2010). Jedná se o dvoukomponentový systém ParR-ParS. Regulátor zde aktivuje expresi operonu, jehož produkty modifikují LPS. Na lipid A v LPS je připojena 4-aminoarabinóza,

kteřá sníží záporný náboj LPS. Kladně nabitý peptid (například polymyxin) se tak už na LPS neváže.



Obrázek 7: Role OMV *V. cholerae* v ochraně buněk před peptidem LL-37 | (A) Kultura rostoucí v nepřítomnosti polymyxinu B. OMV nemohou ochránit kmen A1552 před letální koncentrací LL-37, což vede k hynutí buněk. (B) Kultura rostoucí v přítomnosti subletální koncentrace polymyxinu B. OMV jsou schopné na OmpT vázat přes LDV doménu protein Bap1, který pak slouží jako adaptorový protein pro vazbu mezi OmpT a LL-37. Tím se sníží koncentrace volného LL-37 na subletální, buňky přežívají. OM: vnější membrána, PG: peptidoglykan, IM: cytoplazmatická membrána.

Převzato z Duperthuy et al., (2013).

U *Vibrio cholerae* O1 El Tor kmene A1552 byla sledována tvorba OMV za přítomnosti polymyxinu B v subletální koncentraci (Duperthuy et al., 2013). Tyto OMV nebyly vytvářeny v přítomnosti antibiotika ve větším množství proti kontrole (bez polymyxinu B), ale jejich průměr byl větší. Ve srovnání s kontrolou tyto váčky navíc obsahovaly protein Bap1, což je protein extracelulární matrix asociovaný s biofilmem. Tento protein se váže na OmpT, což je porin ve vnější membráně, který je potom obsažený i v membráně OMV. Na Bap1 se může vázat LL-37, což je antimikrobiální peptid produkovaný mimo jiné epitelem střeva (Bals et al., 1998). Podobně jako polymyxiny permeabilizuje bakteriální membrány (C. C. Lee et al., 2011). Vazbou na OMV se snižuje množství LL-37 v prostředí a OMV tak chrání bakterie před působením tohoto antimikrobiálního peptidu (Obrázek 7). Degradace LL-37 zde nebyla pozorována. Význam objevu spočívá v tom, že inkubace bakterie s jedním antimikrobiálním peptidem (polymyxinovým antibiotikem) způsobuje rezistenci bakterie vůči jinému peptidu

(prostředku vrozené imunitní odpovědi). Produkce OMV byla pozorována i u *Vibrio tasmaniensis* kmene LGP32 (Vanhove et al., 2015). Jedná se o bakterie napadající ústřice. OMV zde mohou sloužit pro vychytávání antimikrobiálních peptidů, které se nachází v hemolymfě ústřic, a tím chránit buňky *V. tasmaniensis* před jejich účinky. V tomto experimentu na kmeni LGP32 bylo dokázáno, že jsou OMV schopné odstranit z roztoku polymyxin B.

5.1.3. Váčky jako vektor v horizontálním genovém přenosu

Funkce membránových měchýřků v horizontálním genovém přenosu byla pozorována u gramnegativní patogenní bakterie *Neisseria gonorrhoeae* (Dorward et al., 1989). Měchýřky jsou zde místo OMV zmiňovány jako membránové váčky nebo „blebs“ (ve smyslu „vyboulení“ membrány). S měchýřky byla nalezena asociovaná DNA, chromozomální i plazmidová. U části měchýřků bylo dokázáno, že obsahovaly DNA uvnitř. Měchýřky s DNA by mohly sloužit ve výměně genetického materiálu mezi bakteriemi. Měchýřky kmene rezistentního vůči antibiotikům obsahovaly R plazmid nesoucí gen pro penicilinázu (β -laktamázu degradující penicilin). Po inkubaci wt kmene s těmito měchýřky (a s DNázou I) došlo k inkorporaci a expresi R plazmidu ve wt kmeni. Došlo tedy k předání genetické informace podobně jako u transformace, ale výhodou transportu DNA uvnitř měchýřků je ochrana před DNázou (v tomto experimentu ale dokázaly váčky ochránit pouze plazmidovou DNA).

Patogenní kmen *Escherichia coli* O157:H7 produkuje měchýřky obsahující DNA různého původu (chromozomální, plazmidovou, fágovou), která se do nich dostává dosud neznámým způsobem (Yaron et al., 2000). Tento kmen byl transformován rekombinantním plazmidem pGFP, který kódoval β -laktamázu účinnou proti ampicilinu. Váčky produkované kmenem O157:H7 poté obsahovaly i plazmidovou DNA pGFP. Po jejich přidání k nekompetentnímu kmeni *Escherichia coli* JM109 došlo k transformaci tohoto kmene plazmidem pGFP a zisku rezistenci k ampicilinu. Jde o důkaz, že váčky by mohly být alternativní cestou výměny genetické informace mezi bakteriemi vedle transformace volnou DNA, konjugace a transdukce.

OMV nesoucí gen *bla*_{OXA-24} pro β -laktamázu k rezistenci proti karbapenemům byly objeveny u dvou kmenů *Acinetobacter baumannii*, které tento gen nesou na plazmidu (Rumbo et al., 2011). Váčky nesoucí plazmidovou DNA byly schopné transformovat citlivý kmen ATCC 17978. Tento kmen byl pak schopný sám produkovat váčky obsahující plazmid s genem pro rezistenci proti karbapenemům. OMV byly uvolňovány tak, že buňky byly dále životaschopné. DNA se musela do váček dostat buď přímo z cytoplazmy (jak bylo popsáno

výše – OMV mohou obsahovat i původně cytoplazmatické komponenty), nebo plazmidy musely neznámým způsobem migrovat do periplazmy, kdy byly potom zahrnuty do uvolňovaného váčku. Výhodou transportu plazmidové DNA uvnitř měchýřku je ochrana před degradací nukleázami. Na základě zjištění, že zvýšení koncentrace OMV nezvýšilo efektivitu transformace, bylo navrženo, že OMV splývají s recipientní buňkou pouze v určitých místech („hot spots“). Na tomto specifickém místě poté soupeří o vstup do buňky měchýřky s plazmidem a bez plazmidu a „hot spot“ vysytí. Další zvýšení množství OMV efektivitu transformace nezvýší. Dále byl u kmene *Acinetobacter baumannii* A_115 pozorován přenos genu *bla_{NDM-1}* na velkém plazmidu (asi 122 kb) pomocí OMV (S. Chatterjee et al., 2017). NDM-1 je β -laktamáza štěpící peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy (kromě monobaktamu aztreonamu). OMV byly schopné transformovat kmeny *A. baumannii* ATCC 19606 a *E. coli* JM109 tak, že byl v recipientní buňce produkován aktivní enzym. Díky němu se u transformovaných kmenů zvýšila MIC proti cefalosporinům a karbapenemům oproti kmenům bez přeneseného plazmidu. Stejně jako u dřívější studie u *Acinetobacter baumannii* jsou OMV schopné ochránit DNA před působením DNázy. Na druhé straně bylo v tomto případě pozorováno zvýšení množství transformovaných bakterií po přidávání narůstajících dávek OMV, což není v souladu s koncepcí o „hot spotech“.

5.2. Grampozitivní bakterie

5.2.1. Transport β -laktamázy

Produkce membránových váčků u grampozitivních bakterií ve spojitosti s rezistencí k antibiotikům byla sledována u patogenní bakterie *Staphylococcus aureus* (E. Y. Lee et al., 2009). Proteomická analýza váčků kmene ATCC 14458 odhalila přítomnost regulačního proteinu MsrR, který má vliv na rezistenci proti antibiotikům – inaktivace genu *msrR* vede ke snížení rezistence proti určitým antibiotikům (Rossi et al., 2003). V měchýřcích byla dále přítomná β -laktamáza BlaZ (J. Lee et al., 2013). Její lokalizace uvnitř váčku byla prokázána, neboť byla zachována její enzymatická aktivita proti ampicilinu (jeden z penicilinů, β -laktamové antibiotikum) v přítomnosti proteázy K. Měchýřky obsahující BlaZ byly schopné před působením ampicilinu ochránit i jiné bakterie – citlivé kmeny *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sérovar Enteritidis, *Staphylococcus aureus* nebo *Staphylococcus epidermidis*.

Zástupce *Mollicutes*, kmen *Acholeplasma laidlawii* PG8, také produkuje membránové měchýřky (EV), které obsahují dle proteomické analýzy především proteiny pocházející z cytoplazmy (Mouzykantov et al., 2014). Produkce těchto EV roste ve stresových podmínkách jako je například nedostatek živin. Jak bylo popsáno výše, *Mollicutes* nemají buněčnou stěnu

s peptidoglykanem, proto jsou z podstaty rezistentní vůči působení β -laktamových antibiotik. V EV *Acholeplasma laidlawii* PG8 ale byla nalezena β -laktamáza. *A. laidlawii* tento enzym vylučovaný v EV nepotřebuje k vlastní ochraně. Proto bylo navrženo, že EV takto mohou chránit jiné bakterie s buněčnou stěnou, které sdílí prostředí s *A. laidlawii* a jsou potřeba k jejímu přežití.

Přestože je toho o vácích grampozitivních bakterií známo méně, bylo prokázáno, že transportují β -laktamázu stejně jako gramnegativní bakterie. U obou skupin bakterií je β -laktamáza alespoň částečně transportována uvnitř měchýřku, kde je chráněná před degradací proteázami (s výjimkou *Bacteroides*). Export β -laktamázy ve vácích poskytuje rezistenci proti antibiotikům nejen bakterii, která vácíky produkuje. Vácíky s tímto enzymem u grampozitivních i gramnegativních bakterií chrání i jiné druhy bakterií senzitivní k antibiotikům.

5.2.2. Odstranění antibiotik z extracelulárního prostoru

Membránové měchýřky (CMV) grampozitivních bakterií mohou sloužit jako ochrana před antibiotiky působícími na cytoplazmatickou membránu stejně jako OMV gramnegativních bakterií. Pro experiment byl vybrán *Staphylococcus aureus* kmen CI1449, který byl získán z krve infikovaného pacienta (Andreoni et al., 2019). Ke kultuře byly přidány CMV jednoho z lysogenních kmenů (viz výše, kapitola 4.1), který je produkoval po indukci flukloxacinem nebo mitomycinem C. Bylo zkoumáno, zda tyto CMV ochrání bakterie kmene CI1449 před působením daptomycinu. Daptomycin je cyklický lipopeptid, který patří k nové generaci antibiotik. Inkorporuje se do cytoplazmatické membrány bakterií a tvoří v ní póry, čímž ruší membránový potenciál. CMV byly po přidání ke kultuře *Staphylococcus aureus* s daptomycinem schopné ochránit buňky před působením daptomycinu. Kromě tohoto *in vitro* experimentu byl proveden i *ex vivo* experiment v odebrané krvi. I v tomto prostředí dokázaly CMV ochránit bakterii před působením daptomycinu. CMV zde slouží jako „návnada“, která chrání bakterie před antibiotikem, které působí v membráně. Tento objev může mít význam v léčbě infekcí způsobených *Staphylococcus aureus*. Daptomycin se v určitých případech používá v kombinaci s flukloxacinem. Vzhledem k tomu, že flukloxacin indukuje vznik CMV, které potom brání účinku daptomycinu, může být léčba kombinací těchto antibiotik neefektivní.

5.2.3. Váčky jako vektor v horizontálním genovém přenosu

Horizontální genový přenos u grampozitivních bakterií zřejmě zatím nebyl prokázán. Následuje zmínka objevu, u kterého autoři předpokládají, že by mohl mít význam pro horizontální genový přenos pomocí váčků u grampozitivních bakterií.

U *Acholeplasma laidlawii* PG8 a PG8R byla porovnáována specifická sekvence – tzv. quinolone-resistance-determining region (QRDR) – v genu *parC* pro C podjednotku topoizomerázy IV (Medvedeva et al., 2014). Topoizomeráza IV patří spolu s DNA gyrázou mezi topoizomerázy typu II, které se účastní superspiralizace DNA. Cílem působení antibiotik chinolonů (mezi které patří ciprofloxacin) je u gramnegativních bakterií DNA gyráza a u grampozitivních bakterií topoizomeráza IV. Změny v sekvenci QRDRs genů kódujících podjednotky ParC topoizomerázy IV mohou vést k rezistenci proti chinolonům, jak bylo ukázáno na jiném zástupci *Mollicutes* – *Mycoplasma genitalium* (Yamaguchi et al., 2013). U *Acholeplasma laidlawii* byla taková změna nalezena v genu pro C podjednotku topoizomerázy IV v QRDR u kmene PG8R, kde byla přítomna bodová mutace (záměna nukleotidů vedoucí k zařazení leucinu místo serinu do sekvence proteinu). V EV kmene PG8R byla poté nalezena tato mutantní QRDR sekvence. Tento objev by mohl mít význam jako mechanismus horizontálního přenosu mutantního genu, jehož exprese vede k rezistenci proti antibiotikům.

6. Závěr

Membránové měchýřky jsou uvolňovány grampozitivními i gramnegativními bakteriemi. Způsob, kterým měchýřky vznikají se liší nejen mezi těmito skupinami bakterií, ale liší se i v rámci těchto skupin.

Obecně je známo více informací o měchýřcích gramnegativních bakterií než o měchýřcích bakterií grampozitivních. Důležitým typem měchýřků jsou měchýřky odvozené od vnější membrány (tzv. OMV). Nejedná se ale o jediný typ měchýřků gramnegativních bakterií. Dalším typem jsou měchýřky obsahující vnější i vnitřní membránu vznikající činností enzymů autolysinu či endolysinu. K těmto dvěma typům lze ještě zmínit tzv. „nanotrubičky“, což jsou membránové útvary propojující buňky bakterií.

O grampozitivních bakteriích a jejich měchýřcích existuje dosud méně informací. Vzhledem ke stavbě své buněčné stěny nemohou uvolňovat OMV. Naproti tomu u nich stejně jako u gramnegativních bakterií vznikají měchýřky působením autolysinu a i grampozitivní bakterie jsou schopné tvořit nanotrubičky. Univerzalitu tvorby membránových váček podporuje fakt, že jsou tvořeny i bakteriemi s netypickou buněčnou stěnou – mykoplasmami a mykobakteriemi. I přes všechny existující informace o váčcích bakterií je ještě potřeba zjistit mnoho dalšího o mechanismu jejich vzniku.

Membránové váčky nejsou pouhými fragmenty membrány, které jsou náhodně uvolňované buňkami do prostředí. Nesou náklad a jsou schopné plnit funkce, které přináší výhody nejen bakterii, která je uvolňuje, ale pomocí mohou i ostatním bakteriálním buňkám v okolí. Například nejlépe prozkoumaný typ měchýřků – OMV – může nést náklad, který se vzhledem k jejich původu ve vnější membráně gramnegativních bakterií může zdát překvapivý. Kromě periplazmatických komponent, které lze v OMV očekávat, obsahují i nukleové kyseliny či cytoplazmatické proteiny, které mohou plnit rozličné funkce. Proteiny asociované s OMV mohou být selektivně balené do těchto membránových útvarů, jak bylo popsáno v této práci u rodu *Bacteroides* a jeho hydroláz. Takto záměrně uvolňované enzymy poté přináší výhody více bakteriím, které tvoří mikrobiotu lidského střeva.

V této práci je pojednávána funkce měchýřků v ochraně bakterií před antibiotiky či antimikrobiálními peptidy. Fakt, že jsou toho měchýřky schopné, je významný i pro léčbu bakteriálních infekcí člověka. Jakožto proces rozšířený napříč gramnegativními a grampozitivními druhy bakterií, jsou membránové měchýřky vylučované i patogenními a oportunisticky patogenními bakteriemi člověka. Membránové váčky mohou nést enzymy, které jsou schopné inaktivovat antibiotika mimo buňku. Některé váčky mohou také obsahovat i geny,

keré takové enzymy kódují. DNA ukrytá uvnitř váčku je chráněná před působením nukleáz, což je výhodné. Byla proto navržena role měchýřků jako alternativy k dosud existujícím způsobům horizontálního genového přenosu (HGT). Zároveň mohou měchýřky sloužit k odstraňování antibiotik z extracelulárního prostoru tím, že snižují jejich koncentraci v okolí buněk.

Další výzkum týkající se membránových měchýřků a jejich role v rezistenci proti antibiotikům má velký význam. Rezistence je jev, ke kterému bude vždy docházet a v současné době je eskalujícím problémem. Jak bylo popsáno v této práci, membránové měchýřky mohou stát za sníženou efektivitou léčby kombinací určitých antibiotik (zde bylo popsáno na kombinaci flukloxacilinu a daptomycinu u *Staphylococcus aureus*), šířením genů pro rezistenci proti antibiotikům, ochraně bakterií degradací antibiotik a jejich odstraňováním z okolí bakteriálních buněk.

7. Seznam použité literatury

- Altindis, E., Fu, Y., & Mekalanos, J. J. (2014). Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(15), E1548–E1556. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403683111>
- Anand, D., & Chaudhuri, A. (2016). Bacterial outer membrane vesicles: New insights and applications. *Molecular Membrane Biology*, *33*(6–8), 125–137. <https://doi.org/10.1080/09687688.2017.1400602>
- Andreoni, F., Toyofuku, M., Menzi, C., Kalawong, R., Shambat, S. M., François, P., Zinkernagel, A. S., & Eberl, L. (2019). Antibiotics stimulate formation of vesicles in staphylococcus aureus in both phage-dependent and -independent fashions and via different routes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(2), Article e01439-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01439-18>
- Bals, R., Wang, X., Zasloff, M., & Wilson, J. M. (1998). The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(16), 9541–9546. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9541>
- Becker, L. A., Çetin, M. S., Hutkins, R. W., & Benson, A. K. (1998). Identification of the gene encoding the alternative sigma factor $\sigma(B)$ from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *Journal of Bacteriology*, *180*(17), 4547–4554. <https://doi.org/10.1128/jb.180.17.4547-4554.1998>
- Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J. C., Raina, S., & Llobès, R. (1998). *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, *180*(18), 4872–4878. <https://doi.org/10.1128/jb.180.18.4872-4878.1998>
- 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. (2017). Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Scientific Reports*, *7*(1), Article 7072. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07288-4>
- Briaud, P., & Carroll, R. K. (2020). Extracellular vesicle biogenesis and functions in gram-positive bacteria. *Infection and Immunity*, *88*(12), Article e00433-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00433-20>
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(10), 620–630. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>

- Chatterjee, S., Mondal, A., Mitra, S., & Basu, S. (2017). Acinetobacter baumannii transfers the bla_{NDM-1} gene via outer membrane vesicles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2201–2207. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx131>
- Chatterjee, S. N., & Das, J. (1967). Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *Journal of General Microbiology*, 49(1), 1–11. <https://doi.org/10.1099/00221287-49-1-1>
- Chernov, V. M., Chernova, O. A., Mouzykantov, A. A., Efimova, I. R., Shaymardanova, G. F., Medvedeva, E. S., & Trushin, M. V. (2011). Extracellular vesicles derived from *Acholeplasma laidlawii* PG8. *TheScientificWorldJournal*, 11, 1120–1130. <https://doi.org/10.1100/tsw.2011.109>
- Ciofu, O., Beveridge, T. J., Kadurugamuwa, J., Walther-Rasmussen, J., & Høiby, N. (2000). Chromosomal β -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(1), 9–13. <https://doi.org/10.1093/jac/45.1.9>
- Deatherage, B. L., Lara, J. C., Bergsbaken, T., Barrett, S. L. R., Lara, S., & Cookson, B. T. (2009). Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Molecular Microbiology*, 72(6), 1395–1407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06731.x>
- 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. (2017). Membrane vesicle secretion and prophage induction in multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in response to ciprofloxacin stress. *Environmental Microbiology*, 19(10), 3930–3937. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13793>
- Dorward, D. W., & Garon, C. F. (1990). DNA Is Packaged within Membrane-Derived Vesicles of Gram-Negative but Not Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1960–1962. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.6.1960-1962.1990>
- Dorward, D. W., Garon, C. F., & Judd, R. C. (1989). Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*, 171(5), 2499–2505. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2499-2505.1989>
- Dubey, G. P., & Ben-Yehuda, S. (2011). Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*, 144(4), 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.015>
- Dubey, G. P., Malli Mohan, G. B., Dubrovsky, A., Amen, T., Tsipshtein, S., Rouvinski, A., Rosenberg, A., Kaganovich, D., Sherman, E., Medalia, O., & Ben-Yehuda, S. (2016). Architecture and Characteristics of Bacterial Nanotubes. *Developmental Cell*, 36(4), 453–461. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.01.013>

- Duperthuy, M., Sjöström, A. E., Sabharwal, D., Damghani, F., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2013). Role of the *Vibrio cholerae* Matrix Protein Bap1 in Cross-Resistance to Antimicrobial Peptides. *PLoS Pathogens*, *9*(10), Article e1003620. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003620>
- Ekiert, D. C., Bhabha, G., Isom, G. L., Greenan, G., Ovchinnikov, S., Henderson, I. R., Cox, J. S., & Vale, R. D. (2017). Architectures of Lipid Transport Systems for the Bacterial Outer Membrane. *Cell*, *169*(2), 273-285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.019>
- Elhenawy, W., Debelyy, M. O., & Feldman, M. F. (2014). Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into *Bacteroides* outer membrane vesicles. *MBio*, *5*(2), Article e00909-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00909-14>
- Fernández, L., Gooderham, W. J., Bains, M., McPhee, J. B., Wiegand, I., & Hancock, R. E. W. (2010). Adaptive resistance to the “last hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(8), 3372–3382. <https://doi.org/10.1128/AAC.00242-10>
- Fulsundar, S., Harms, K., Flaten, G. E., Johnsen, P. J., Chopade, B. A., & Nielsen, K. M. (2014). Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(11), 3469–3483. <https://doi.org/10.1128/AEM.04248-13>
- Gaurivaud, P., Ganter, S., Villard, A., Manso-Silvan, L., Chevret, D., Boulé, C., Monnet, V., & Tardy, F. (2018). Mycoplasmas are no exception to extracellular vesicles release: Revisiting old concepts. *PLoS ONE*, *13*(11), Article e0208160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208160>
- George, K. M., Chatterjee, D., Gunawardana, G., Welty, D., Hayman, J., Lee, R., & Small, P. L. C. (1999). Mycolactone: A polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science*, *283*(5403), 854–857. <https://doi.org/10.1126/science.283.5403.854>
- Grabowicz, M., & Silhavy, T. J. (2017). Envelope Stress Responses: An Interconnected Safety Net. *Trends in Biochemical Sciences*, *42*(3), 232–242. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.10.002>
- Guo, M. S., Updegrove, T. B., Gogol, E. B., Shabalina, S. A., Gross, C. A., & Storz, G. (2014). MicL, a new σ E-dependent sRNA, combats envelope stress by repressing synthesis of Lpp, the major outer membrane lipoprotein. *Genes and Development*, *28*(14), 1620–1634. <https://doi.org/10.1101/gad.243485.114>

- Hughes, G. W., Hall, S. C. L., Laxton, C. S., Sridhar, P., Mahadi, A. H., Hatton, C., Piggot, T. J., Wotherspoon, P. J., Leney, A. C., Ward, D. G., Jamshad, M., Spana, V., Cadby, I. T., Harding, C., Isom, G. L., Bryant, J. A., Parr, R. J., Yakub, Y., Jeeves, M., ... Knowles, T. J. (2019). Evidence for phospholipid export from the bacterial inner membrane by the Mla ABC transport system. *Nature Microbiology*, *4*(10), 1692–1705. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0481-y>
- Jiang, Y., Kong, Q., Roland, K. L., & Curtiss, R. (2014). Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. *International Journal of Medical Microbiology*, *304*(3–4), 431–443. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.02.006>
- Jin, J. S., Kwon, S. O., Moon, D. C., Gurung, M., Lee, J. H., Kim, S. Il, & Lee, J. C. (2011). *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein a via outer membrane vesicles. *PLoS ONE*, *6*(2), Article e17027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017027>
- Kadurugamuwa, J. L., & Beveridge, T. J. (1995). 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. *Journal of Bacteriology*, *177*(14), 3998–4008. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.3998-4008.1995>
- Kamio, Y., & Nikaido, H. (1976). Outer Membrane of *Salmonella Typhimurium*: Accessibility of Phospholipid Head Groups to Phospholipase C and Cyanogen Bromide Activated Dextran in the External Medium. *Biochemistry*, *15*(12), 2561–2570. <https://doi.org/10.1021/bi00657a012>
- Kim, S. W., Park, S. Bin, Im, S. P., Lee, J. S., Jung, J. W., Gong, T. W., Lazarte, J. M. S., Kim, J., Seo, J. S., Kim, J. H., Song, J. W., Jung, H. S., Kim, G. J., Lee, Y. J., Lim, S. K., & Jung, T. S. (2018). Outer membrane vesicles from β -lactam-resistant *Escherichia coli* enable the survival of β -lactam-susceptible *E. coli* in the presence of β -lactam antibiotics. *Scientific Reports*, *8*(1), Article 5402. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23656-0>
- Koeppen, K., Hampton, T. H., Jarek, M., Scharfe, M., Gerber, S. A., Mielcarz, D. W., Demers, E. G., Dolben, E. L., Hammond, J. H., Hogan, D. A., & Stanton, B. A. (2016). A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles. *PLoS Pathogens*, *12*(6), Article e1005672. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005672>
- Koning, R. I., de Breij, A., Oostergetel, G. T., Nibbering, P. H., Koster, A. J., & Dijkshoorn, L. (2013). Cryo-electron tomography analysis of membrane vesicles from *Acinetobacter baumannii* ATCC19606T. *Research in Microbiology*, *164*(5), 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.02.007>

- Kulkarni, H. M., Nagaraj, R., & Jagannadham, M. V. (2015). Protective role of *E. coli* outer membrane vesicles against antibiotics. *Microbiological Research*, *181*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.07.008>
- Lappann, M., Otto, A., Becher, D., & Vogel, U. (2013). Comparative proteome analysis of spontaneous outer membrane vesicles and purified outer membranes of *Neisseria meningitidis*. *Journal of Bacteriology*, *195*(19), 4425–4435. <https://doi.org/10.1128/JB.00625-13>
- Lee, C. C., Sun, Y., Qian, S., & Huang, H. W. (2011). Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. *Biophysical Journal*, *100*(7), 1688–1696. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.018>
- 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. (2009). Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics*, *9*(24), 5425–5436. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900338>
- Lee, J. H., Choi, C. W., Lee, T., Kim, S. Il, Lee, J. C., & Shin, J. H. (2013). Transcription Factor σ B Plays an Important Role in the Production of Extracellular Membrane-Derived Vesicles in *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE*, *8*(8), Article e73196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073196>
- Lee, J., Lee, E. Y., Kim, S. H., Kim, D. K., Park, K. S., Kim, K. P., Kim, Y. K., Roh, T. Y., & Gho, Y. S. (2013). *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles carry biologically active β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(6), 2589–2595. <https://doi.org/10.1128/AAC.00522-12>
- 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. (2014). *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *Journal of Bacteriology*, *196*(13), 2355–2366. <https://doi.org/10.1128/JB.01493-14>
- Liao, Y. T., Kuo, S. C., Chiang, M. H., Lee, Y. T., Sung, W. C., Chen, Y. H., Chen, T. L., & Fung, C. P. (2015). *Acinetobacter baumannii* extracellular OXA-58 is primarily and selectively released via outer membrane vesicles after sec-dependent periplasmic translocation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(12), 7346–7354. <https://doi.org/10.1128/AAC.01343-15>

- Liao, Y. T., Kuo, S. C., Lee, Y. T., Chen, C. P., Lin, S. W., Shen, L. J., Fung, C. P., Cho, W. L., & Chen, T. L. (2014). Sheltering effect and indirect pathogenesis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in polymicrobial infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(7), 3983–3990. <https://doi.org/10.1128/AAC.02636-13>
- Lipinska, B., Sharma, S., & Georgopoulos, C. (1988). Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: A σ^{32} -independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Research*, *16*(21), 10053–10067. <https://doi.org/10.1093/nar/16.21.10053>
- Malinverni, J. C., & Silhavy, T. J. (2009). An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(19), 8009–8014. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903229106>
- Manning, A. J., & Kuehn, M. J. (2011). Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiology*, *11*, Article 258. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>
- Marsollier, L., Brodin, P., Jackson, M., Korduláková, J., Tafelmeyer, P., Carbonnelle, E., Aubry, J., Milon, G., Legras, P., Saint André, J. P., Leroy, C., Cottin, J., Guillou, M. L. J., Reysset, G., & Cole, S. T. (2007). Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PLoS Pathogens*, *3*(5), Article e62. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030062>
- Mashburn-Warren, L., Howe, J., Garidel, P., Richter, W., Steiniger, F., Roessle, M., Brandenburg, K., & Whiteley, M. (2008). Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: Insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Molecular Microbiology*, *69*(2), 491–502. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06302.x>
- McBroom, A. J., & Kuehn, M. J. (2007). Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular Microbiology*, *63*(2), 545–558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x>
- McCaig, W. D., Koller, A., & Thanassi, D. G. (2013). Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *Journal of Bacteriology*, *195*(6), 1120–1132. <https://doi.org/10.1128/JB.02007-12>
- Medvedeva, E. S., Baranova, N. B., Mouzykantov, A. A., Grigorieva, T. Y., Davydova, M. N., Trushin, M. V., Chernova, O. A., & Chernov, V. M. (2014). Adaptation of mycoplasmas to antimicrobial agents: *Acholeplasma laidlawii* extracellular vesicles mediate the export of ciprofloxacin and a mutant gene related to the antibiotic target. *The Scientific World Journal*, *2014*, Article 150615. <https://doi.org/10.1155/2014/150615>

- Mouzykantov, A. A., Baranova, N. B., Medvedeva, E. S., Grigor'eva, T. Y., Chernova, O. A., & Chernov, V. M. (2014). Exported mycoplasmal proteins: Proteome of extracellular membrane vesicles of *Acholeplasma laidlawii* PG8. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, *455*(1), 43–48. <https://doi.org/10.1134/S160767291402001X>
- Nagakubo, T., Nomura, N., & Toyofuku, M. (2020). Cracking Open Bacterial Membrane Vesicles. *Frontiers in Microbiology*, *10*, Article 3026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03026>
- Okamoto, K., Mudd, J. A., Mangan, J., Huang, W. M., Subbaiah, T. V., & Marmor, J. (1968). Properties of the defective phage of *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, *34*(3), 413–428. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90169-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90169-1)
- Poirel, L., Marqué, S., Héritier, C., Segonds, C., Chabanon, G., & Nordmann, P. (2005). OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(1), 202–208. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.202-208.2005>
- Prados-Rosales, R., Baena, A., Martinez, L. R., Luque-Garcia, J., Kalscheuer, R., Veeraghavan, U., Camara, C., Nosanchuk, J. D., Besra, G. S., Chen, B., Jimenez, J., Glatman-Freedman, A., Jacobs, W. R., Porcelli, S. A., & Casadevall, A. (2011). Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(4), 1471–1483. <https://doi.org/10.1172/JCI44261>
- Rath, P., Huang, C., Wang, T., Wang, T., Li, H., Prados-Rosales, R., Elemento, O., Casadevall, A., & Nathan, C. F. (2013). Genetic regulation of vesiculogenesis and immunomodulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(49), E4790–E4797. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320118110>
- Rawadi, G., & Roman-Roman, S. (1996). Mycoplasma membrane lipoproteins induce proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, *64*(2), 637–643. <https://doi.org/10.1128/iai.64.2.637-643.1996>
- Remis, J. P., Wei, D., Gorur, A., Zemla, M., Haraga, J., Allen, S., Witkowska, H. E., Costerton, J. W., Berleman, J. E., & Auer, M. (2014). Bacterial social networks: Structure and composition of *Mycococcus xanthus* outer membrane vesicle chains. *Environmental Microbiology*, *16*(2), 598–610. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12187>
- 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. (2016). A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nature Communications*, *7*, Article 10515. <https://doi.org/10.1038/ncomms10515>

- Rossi, J., Bischoff, M., Wada, A., & Berger-Bächi, B. (2003). MsrR, a putative cell envelope-associated element involved in *Staphylococcus aureus* sarA attenuation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2558–2564. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2558-2564.2003>
- Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J. A., Soares, N. C., Mosquera, A., Chaves, F., & Bou, G. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: A new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3084–3090. <https://doi.org/10.1128/AAC.00929-10>
- Schaar, V., Nordström, T., Mörgelin, M., & Riesbeck, K. (2011). *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles carry β -lactamase and promote survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by inactivating amoxicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8), 3845–3853. <https://doi.org/10.1128/AAC.01772-10>
- Schaar, V., Paulsson, M., Mörgelin, M., & Riesbeck, K. (2013). Outer membrane vesicles shield *Moraxella catarrhalis* β -lactamase from neutralization by serum IgG. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(3), 593–600. <https://doi.org/10.1093/jac/dks444>
- Schertzer, J. W., & Whiteley, M. (2012). A bilayer-couple model of bacterial outer membrane vesicle biogenesis. *MBio*, 3(2), Article e00297-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00297-11>
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2013). Synthetic effect between envelope stress and lack of outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 195(18), 4161–4173. <https://doi.org/10.1128/JB.02192-12>
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: Biogenesis and functions. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 605–619. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>
- Schwechheimer, C., Sullivan, C. J., & Kuehn, M. J. (2013). Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. *Biochemistry*, 52(18), 3031–3040. <https://doi.org/10.1021/bi400164t>
- Shrivastava, R., Jiang, X., & Chng, S. S. (2017). Outer membrane lipid homeostasis via retrograde phospholipid transport in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 106(3), 395–408. <https://doi.org/10.1111/mmi.13772>
- Spiess, C., Beil, A., & Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, 97(3), 339–347. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80743-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80743-6)

- Stentz, R., Horn, N., Cross, K., Salt, L., Brearley, C., Livermore, D. M., & Carding, S. R. (2015). Cephalosporinases associated with outer membrane vesicles released by *Bacteroides* spp. protect gut pathogens and commensals against β -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(3), 701–709. <https://doi.org/10.1093/jac/dku466>
- Tashiro, Y., Ichikawa, S., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H., & Nomura, N. (2010). Pseudomonas quinolone signal affects membrane vesicle production in not only gram-negative but also gram-positive bacteria. *Microbes and Environments*, *25*(2), 120–125. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09182>
- Toyofuku, M., Cárcamo-Oyarce, G., Yamamoto, T., Eisenstein, F., Hsiao, C. C., Kurosawa, M., Gademann, K., Pilhofer, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2017). Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. *Nature Communications*, *8*(1), Article 481. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00492-w>
- Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(1), 13–24. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
- Tran, A. X., Lester, M. E., Stead, C. M., Raetz, C. R. H., Maskell, D. J., McGrath, S. C., Cotter, R. J., & Trent, M. S. (2005). Resistance to the antimicrobial peptide polymyxin requires myristoylation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipid A. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(31), 28186–28194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505020200>
- Turnbull, L., Toyofuku, M., Hynen, A. L., Kurosawa, M., Pessi, G., Petty, N. K., Osvath, S. R., Cárcamo-Oyarce, G., Gloag, E. S., Shimoni, R., Omasits, U., Ito, S., Yap, X., Monahan, L. G., Cavaliere, R., Ahrens, C. H., Charles, I. G., Nomura, N., Eberl, L., & Whitchurch, C. B. (2016). Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nature Communications*, *7*, Article 11220. <https://doi.org/10.1038/ncomms11220>
- Udekwa, K. I., Darfeuille, F., Vogel, J., Reimegård, J., Holmqvist, E., & Wagner, E. G. H. (2005). Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes and Development*, *19*(19), 2355–2366. <https://doi.org/10.1101/gad.354405>
- Udekwa, K. I., Gerhart, E., & Wagner, H. (2007). Sigma E controls biogenesis of the antisense RNA MicA. *Nucleic Acids Research*, *35*(4), 1279–1288. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1154>
- Vanhove, A. S., Duperthuy, M., Charrière, G. M., Le Roux, F., Goudenège, D., Gourbal, B., Kieffer-Jaquinod, S., Couté, Y., Wai, S. N., & Destoumieux-Garzón, D. (2015). Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environmental Microbiology*, *17*(4), 1152–1165. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12535>

- Wai, S. N., Lindmark, B., Söderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J., Jass, J., Richter-Dahlfors, A., Mizunoe, Y., & Uhlin, B. E. (2003). Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*, *115*(1), 25–35. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00754-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00754-2)
- Walsh, N. P., Alba, B. M., Bose, B., Gross, C. A., & Sauer, R. T. (2003). OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell*, *113*(1), 61–71. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00203-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00203-4)
- Wiedmann, M., Arvik, T. J., Hurley, R. J., & Boor, K. J. (1998). General stress transcription factor σ B and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, *180*(14), 3650–3656. <https://doi.org/10.1128/jb.180.14.3650-3656.1998>
- Work, E., Knox, K. W., & Vesik, M. (1966). The chemistry and electron microscopy of an extracellular lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *133*(2), 438–449. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1966.tb52382.x>
- Yamaguchi, Y., Takei, M., Kishii, R., Yasuda, M., & Deguchi, T. (2013). Contribution of topoisomerase IV mutation to quinolone resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(4), 1772–1776. <https://doi.org/10.1128/AAC.01956-12>
- Yaron, S., Kolling, G. L., Simon, L., & Matthews, K. R. (2000). Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(10), 4414–4420. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4414-4420.2000>
- Yu, F., Inouye, S., & Inouye, M. (1986). Lipoprotein-28, a cytoplasmic membrane lipoprotein from *Escherichia coli*. Cloning, DNA sequence, and expression of its gene. *Journal of Biological Chemistry*, *261*(5), 2284–2288. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)35931-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)35931-8)