



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

## **Grao en Bioloxía**

### **Memoria do Traballo de Fin de Grao**

**Revisión bibliográfica: Formación e funcións das  
vesículas bacterianas**

**Revisión bibliográfica: Formación y funciones de las  
vesículas bacterianas**

**Literature review: Formation and functions of bacterial  
vesicles**

**Cristal Camafreita Rey**

**Curso: 2022 - 2023.**

**Convocatoria: Setembro**

*Directora: María Concepción Herrero López*

## Resumo

As vesículas son estruturas esféricas cun tamaño de entre 10-300nm, delimitadas por unha dobre capa de lípidos, proteínas e outros compoñentes procedentes principalmente da membrana de orixe. As vesículas están presentes nos tres Dominios da vida. As vesículas bacterianas orixínanse das membranas das bacterias produtoras e por iso comparten compoñentes da parede e incluso doutras rexións da bacteria que as orixinou.

Existen varios modelos propostos para a formación de vesículas en bacterias Gram negativas. O modelo do sistema de transporte de fosfolípidos VacJ/Yrb ABC presenta características que fan considerar que nun futuro se estableza como modelo estándar en bacterias Gram negativas. O coñecemento sobre a bióxénese das vesículas das bacterias Gram positivas é menor, pero estudos de microscopía de reconstrución óptica reconstrución óptica estocástica (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM) axudou a esclarecer un pouco máis este proceso e propuxéronse tres modelos a partir da información obtida.

As vesículas realizan funcións básicas como a adquisición de nutrientes ou o transporte de substancias, pero tamén realizan outras máis específicas como a colonización dos organismos hóspedes no caso das bacterias patóxenas.

## Resumen

Las vesículas son estructuras esféricas con un tamaño de entre 10-300nm, delimitadas por una doble capa de lípidos, proteínas y otros componentes procedentes principalmente de la membrana de origen. Las vesículas están presentes en los tres Dominios da vida. Las vesículas bacterianas se originan de las membranas de las bacterias productoras y por eso comparten componentes de la pared e incluso de otras regiones de la bacteria que las originó.

Existen varios modelos propuestos para la formación de vesículas en bacterias Gram negativas. El modelo del sistema de transporte de fosfolípidos VacJ/Yrb ABC presenta características que hacen considerar que en un futuro se establezca como modelo estándar en bacterias Gram negativas. El conocimiento sobre la biogénesis de las vesículas de las bacterias Gram positivas es menor, pero estudios de microscopía de reconstrucción óptica estocástica (Stochastic

Optical Reconstruction Microscopy, STORM) ayudó a esclarecer un poco más este proceso y se propusieron tres modelos a partir de la información obtenida.

Las vesículas realizan funciones básicas como la adquisición de nutrientes o el transporte de sustancias, pero también realizan otras más específicas como la colonización de los organismos huéspedes en el caso de las bacterias patógenas.

### Abstract

Vesicles are spherical structures with a size between 10-300nm, delimited by a double layer of lipids, proteins and other components coming mainly from the membrane of origin. Vesicles are present in all three domains of life. Bacterial vesicles originate from the membranes of the producing bacteria and therefore share components of the wall and even other regions of the bacteria that originated them.

There are several proposed models for vesicle formation in Gram-negative bacteria. The model of the VacJ/Yrb ABC phospholipid transport system presents characteristics that make it considered that in the future it will be established as a standard model in Gram-negative bacteria. Knowledge about the biogenesis of vesicles in Gram-positive bacteria is less, but stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) studies helped to clarify this process a little more and three models were proposed based on the information obtained.

The vesicles carry out basic functions such as the acquisition of nutrients or the transport of substances, but they also carry out other more specific ones such as the colonization of host organisms in the case of pathogenic bacteria.

### Palabras clave

OMVs, MVs, biogénesis, funciones, patogénesis, factores de virulencia, biopelículas, transferencia de genes

### Palabras clave

OMVs, MVs, biogénesis, funciones, patogénesis, factores de virulencia, biopelículas, transferencia de genes

## Keywords

OMVs, MVs, biogenesis, functions, pathogenesis, virulence factors, biofilms, gene transfer

## Abreviaturas

Lpp: Lipoproteínas

LPS: Lipopolisacáridos

MVs: membrane vesicles

OmpA: Porina de membrana externa

OMVs: outer-membrane vesicles

PQS: *Pseudomonas* quinolone signal

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Obxectivos</b>	2
<b>3. Material e métodos</b>	2
<b>3.1. Estratexia de busca</b>	2
<b>3.2. Selección de artigos</b>	2
<b>3.3. Extracción de datos</b>	2
<b>4. Bioxénese das vesículas bacterias</b>	3
<b>4.1. Modelos de formación en Gram negativas</b>	3
4.1.1. <i>Redución ou traslado dos enlaces da envoltura</i>	3
4.1.2. <i>Acumulación de proteínas mal pregadas ou compoñentes da envoltura no espazo periplásmico</i>	4
4.1.3. <i>Enriquecemento de lípidos ou moléculas unidas a lípidos na membrana externa</i>	5
4.1.4. <i>Acumulación de fosfolípidos no prego exterior da membrana externa</i>	5
4.1.5. <i>Outros modelos</i>	6
<b>4.2. Modelos de formación en Gram positivas</b>	7
<b>4.3. Factores de regulación</b>	9
4.3.1. <i>Factores ambientais</i>	9
4.3.2. <i>Estrés celular</i>	10
4.3.3. <i>Factores xenéticos</i>	10
<b>5. Funcións das vesículas bacterianas</b>	11
<b>5.1. Adquisición de nutrientes</b>	12
<b>5.2. Homeostase e defensa</b>	13
<b>5.3. Transporte de factores de virulencia</b>	14
<b>5.4. Biopelículas e transferencia de xenes</b>	15
<b>6. Conclusións/Conclusiones/Conclusions</b>	15
<b>7. Referencias</b>	17

## 1. Introdución

As vesículas son estruturas esféricas cun tamaño de entre 10-300nm, están delimitadas por unha dobre capa de lípidos e proteínas e tamén, presentan outros compoñentes procedentes principalmente da membrana de orixe. As vesículas están presentes nos tres Dominios da vida. As vesículas de bacterias Gram positivas reciben o nome de vesículas de membrana (membrane vesicles, MVs) (Brown et al., 2015; Liu et al., 2018; Schwechheimer e Kuehn, 2015; Yu et al., 2018); e as máis estudadas, as liberadas polas bacterias Gram negativas, reciben o nome de vesículas de membrana externa (outer-membrane vesicles (OMVs) porque derivan da membrana externa da súa parede celular (Ellis e Kuehn, 2010; Lee et al., 2008; Roier et al., 2016; Yu et al., 2018).

A liberación das vesículas ocorre de xeito natural, durante o crecemento da bacteria (Ellis e Kuehn, 2010; Roier et al., 2016) e trátase dun proceso evolutivo debido as vantaxes que ofrece en distintas condicións e medios naturais ás bacterias produtoras (Roier et al., 2016; Schwechheimer e Kuehn, 2015).

Existen varios modelos de bioxénese en Gram negativas pero os máis coñecidos son tres: redución ou traslado dos enlaces da envoltura; acumulación de proteínas mal pregadas ou compoñentes da envoltura no espazo periplásmico e enriquecemento de lípidos ou moléculas unidas a lípidos na membrana externa (Furuyama e Sircili, 2021; Roier et al., 2016). O coñecemento sobre a bioxénese e os mecanismos de regulación das vesículas bacterianas de Gram positivas é máis limitado co das Gram negativas (Brown et al., 2015; Jeong et al., 2022; Yu et al., 2018). Sen embargo, recentemente propuxéronse tres modelos de bioxénese grazas a un estudo no que se obtiveron imaxes de súper resolución das vesículas (Jeong et al., 2022).

As vesículas participan nas funcións biolóxicas das bacterias contribuindo na súa supervivencia e virulencia (Kulp e Kuehn, 2010; Schwechheimer e Kuehn, 2015); na adquisición de nutrientes, no mantemento da envoltura celular, na defensa fronte a axentes externos, no transporte de factores de virulencia das bacterias patóxenas, na formación de biopelículas e na transferencia horizontal de xenes

(Brown et al., 2015; Furuyama e Sircili, 2021; Villageliu e Samuelson, 2022; Xue et al., 2022).

## 2. Obxectivos

Este revisión pretende recoller a información máis recente sobre os modelos propostos para a formación de vesículas de bacterias Gram negativas e coñecer os posibles mecanismos de formación das Gram positivas. Así mesmo, pretende destacar a relevancia das vesículas para a supervivencia das bacterias formadoras mostrando algunhas das funcións nas que participan.

## 3. Material e métodos

A elaboración deste traballo, ao tratarse dunha revisión bibliográfica, fundaméntase na busca e contraste da información máis recente e especializada sobre a bioxénese e as funcións das vesículas bacterianas.

### 3.1. Estratexia de busca

A busca de información realizouse en bases de datos como “Web of Science” ou “Pubmed”. Nunha primeira busca, empregáronse termos xerais como poden ser “bacterial vesicles”, “vesicles Gram positive”, “OMVs” ou “MVs” e non se limitaron nin a fecha de publicación nin o tipo de artigo. Nas seguintes, xa se seleccionaron preferentemente artigos de revisión e con datas de publicación recentes. A terminoloxía utilizada foi máis específica atendendo o tema de interese: “biogenesis”, “funtions”, “gene transfer”, “biofilms” ou “pathogenesis”.

### 3.2. Selección de artigos

Preferiblemente, escolléronse artigos do tipo revisión bibliográfica. Na súa maioría, as datas de publicación abarcan do ano 2015 en diante para asegurarnos que obter a información máis actual. Tamén se aceptaron artigos relacionados cos temas a tratar ou citados noutros escollidos previamente que puideran conter información relevante.

### 3.3. Extracción de datos

Logo da criba dos artigos, estudouse e recompilouse a información contida que se considerou máis actual e relevante sobre os temas de interese.

## 4. Bioxénese das vesículas bacterias

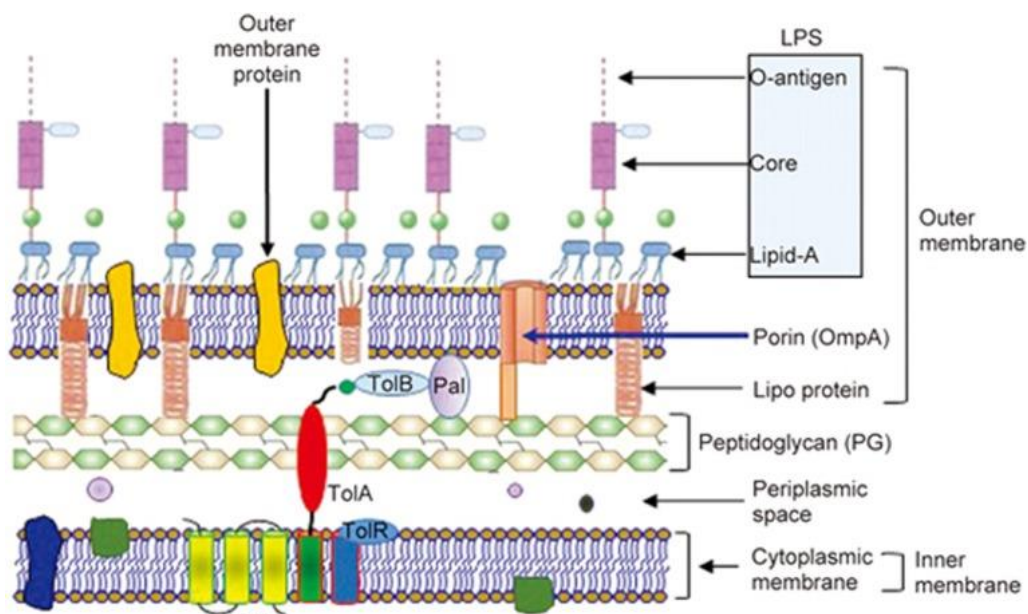
### 4.1. Modelos de formación en Gram negativas

Coñécense numerosas bacterias Gram negativas que producen vesículas mentres que das Gram positivas se coñecen menos (Willey et al., 2023). Por esta razón, a maior parte da información sobre a bioxénese procede de estudos sobre as Gram negativas aínda que, polo de agora, se descoñece un mecanismo xeral de formación (Roier et al., 2016).

Os modelos coñecidos para a formación de OMVs son os seguintes:

#### 4.1.1. Redución ou traslado dos enlaces da envoltura

A envoltura celular mantense unida por varios enlaces: 1) as lipoproteínas (Lpp) unen de xeito covalente a membrana externa coa capa de peptidoglicano subxacente; 2) a porina de membrana externa (OmpA) une de xeito non covalente a membrana externa co peptidoglicano subxacente e 3) o complexo Tol-Pal mantén interaccións non covalentes con toda a parede celular (figura 1).



**Figura 1:** Interaccións da envoltura celular de Gram negativas. Imaxe obtida de Yu et al., 2018.

As proteínas de membrana externa Lpp son moi abundantes, a maior parte están entrecruzadas co peptidoglicano e mostran unha distribución uniforme na parede



celular (Schwechheimer e Kuehn, 2015). A redución dos enlaces, debido a deleccións ou outras mutacións, provoca inestabilidade na membrana. Isto desencadea, ben unha fuga celular se a diminución dos enlaces é completa, ou ben unha hipervesiculación en caso de que sexa parcial (Schwechheimer e Kuehn, 2015; Yu et al., 2018). Así, un mutante de *Escherichia coli* carece dunha lipoproteína chamada *Nlpl* que controla a actividade dunha endopeptidasa de peptidoglicano, que se encarga de romper os enlaces peptídicos desta capa dando lugar a hipervesiculación (Schwechheimer e Kuehn, 2015).

A porina OmpA presenta un sitio de unión a un compoñente do peptidoglicano, o ácido diaminopimélico (DAP), e as bacterias que carecen desta porina, como por exemplo mutantes de *Acinetobacter baumannii*, teñen a produción das OMVs incrementada probablemente pola diminucións destas unións (Schwechheimer e Kuehn, 2015).

O complexo Tol-Pal participa no proceso da división celular xa que contribúe na invaxinación da membrana externa e na estabilidade da membrana. A diferenza das proteínas Lpp, este complexo localízase preferentemente nos polos celulares (Sartorio et al., 2021; Schwechheimer e Kuehn, 2015). Ao igual cos casos anteriores, a interrupción dos seus enlaces causan inestabilidade na membrana o que conleva ó aumento de vesículas (Yu et al., 2018). Polo tanto, o decrecemento ou traslado das interaccións xunto co crecemento máis rápido da membrana externa respecto ao peptidoglicano subxacente inicia a creación das OMVs (Furuyama e Sircili, 2021; Lee et al., 2008; Roier et al., 2016; Yu et al., 2018).

#### 4.1.2. Acumulación de proteínas mal pregadas ou compoñentes da envoltura no espazo periplásmico

O estrés térmico ou os erros durante a biosíntese e remodelación da parede celular dan lugar a acumulación de proteínas mal pregadas, lipopolisacáridos aberrantes ou fragmentos de peptidoglicano no espazo periplásmico da envoltura celular (Aytar-Çelik et al., 2022; Furuyama e Sircili, 2021; Roier et al., 2016; Yu et al., 2018). Isto aumenta a presión de turxencia da membrana externa facendo que se avulte e se liberen OMVs que eliminan estes compoñentes perxudiciais (Aytar-Çelik et al., 2022; Furuyama e Sircili, 2021; Roier et al., 2016;

Sartorio et al., 2021; Schwechheimer e Kuehn, 2015; Yu et al., 2018). Como é o caso de *Porphyromonas gingivalis* se descubriu que un mutante que carecía de autolisinas liberaban máis OMVs que a cepa salvaxe (Hayashi et al., 2002). As autolisinas son hidrolasas de mureína/peptidoglicano que está implicadas na renovación, reciclaxe e na división celular da parede celular, polo tanto, a súa ausencia provocaría que a parede non se degrade por completo acumulándose os fragmentos que serían eliminados a través de las OMVs. Por exemplo, as hidrolasas de mureína/peptidoglicano como MltA (Hayashi et al., 2002; Lee et al., 2008; Sartorio et al., 2021).

#### 4.1.3. Enriquecemento de lípidos ou moléculas unidas a lípidos na membrana externa

Este modelo propúxose para *Pseudomonas aeruginosa* e especies afíns, e defende que o enriquecemento de moléculas específicas poden inducir a curvatura da membrana, iniciando así a formación de OMVs. Estas moléculas tamén se lles chama “moléculas indutoras” de curvatura e poden ser fosfolípidos, lipopolisacáridos (LPS) e a quinolona sinal de *Pseudomonas* (Pseudomonas quinolone signal, PQS) (Jan, 2017; Kulp e Kuehn, 2010; Lee et al., 2008; Roier et al., 2016; Yu et al., 2018). Esta quinolona sinal é unha molécula moi hidrófoba que abunda nas vesículas (Kulp e Kuehn, 2010; Schwechheimer e Kuehn, 2015; Yu et al., 2018). Pénsase que a PQS aumenta as repulsións aniónicas entre as moléculas de LPS mediante o secuestro de catións di-valentes que compoñen pontes salinos estabilizadores ( $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ) entre os LPS que están cargados negativamente. Isto fai que a membrana externa de avulte e forme vesículas que liberan estas repulsións de carga (Aytar-Çelik et al., 2022; Furuyama e Sircili, 2021; Jan, 2017; Lee et al., 2008; Roier et al., 2016; Sartorio et al., 2021; Yu et al., 2018).

#### 4.1.4. Acumulación de fosfolípidos no prego exterior da membrana externa

Roier et al. (2016), estudaron o sistema de transporte de fosfolípidos VacJ/Yrb ABC principalmente en *Haemophilus influenzae* e no *Vibrio cholera*. Descubriron que a supresión ou a expresión reducida dos xenes *vacJ* ou *yrbE* provocan que o sistema de transporte non funcione correctamente polo que se acumulan fosfolípidos no folla externa da membrana externa, o que fai que se expanda máis rapidamente que o resto da parede subxacente e se inicie a vesiculación.

Ao comparar as OMVs da cepa salvaxe fronte a do mutante, comprobouse que as do mutante estaban enriquecidas en fosfolípidos, o que apoia o dito anteriormente. Tamén se descubriu que condicións limitadas de ferro desencadean unha regulación á baixa do transportador pola acción do regulador de absorción férrica (Fur) e isto, a súa vez, dá lugar á sobreprodución de OMVs en *H. influenzae*, *V. cholera* e *E. coli*. Ademais, no estudo de mostras *in vivo* mostraron sensibilidade ao soro, o que lles fixo supoñer que producen máis OMVs para combater cos anticorpos e o sistema complemento e así poder adaptarse ao organismo hóspede. Tendo en conta que este modelo se demostrou en bacterias Gram negativas pouco relacionadas, sería posible considerar este modelo de bioxénese como un mecanismo xeral entre as bacterias Gram negativas (Roier et al., 2016; Yu et al., 2018; Sartorio et al., 2021).

#### 4.1.5. Outros modelos

Desacilación do lípido A: O lípido A é un constituínte dos lipopolisacáridos (LPS) e serve de unión coa capa exterior da membrana externa da envoltura (Elhenawy et al., 2016). No patóxeno *P. gingivalis* sintetízanse e empaquetáanse nas OMVs, LPS. O lípido A empaquetado encóntrase desacilado, mentres que na membrana da célula non, o que fai considerar que as OMVs se producen pola remodelación da membrana externa (Sartorio et al., 2021). Foi nun estudo en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium no que se puxo a proba a hipótese de que a desacilación do lípido A provocaría modificacións na súa forma que farían que a membrana externa se pregara e se formaran as OMVs (Elhenawy et al., 2016; Yu et al., 2018). Comprobouse que a encima PagL, encargada de desacilar aos lípidos A, fai que se acumulen estas moléculas exclusivamente na membrana externa das OMVs (Elhenawy et al., 2016; Yu et al., 2018). A pesar de que existe outro modelo, o do transportar de fosfolípidos explicado anteriormente, non ter que ser excluínte con este, senón que poderían participar na bioxénese das vesículas conxuntamente (Elhenawy et al., 2016).

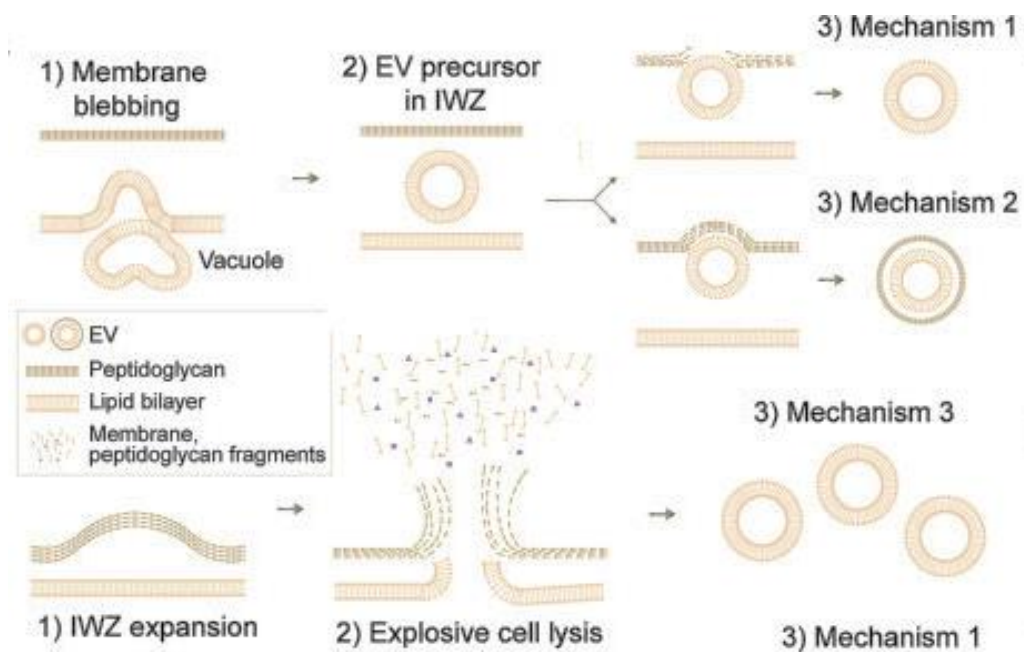
Lise celular explosiva: A lise celular explosiva produce fragmentos rotos de membrana que se circularizan ao instante en OMVs (Mandal et al., 2021; Turnbull et al., 2016; Yu et al., 2018). Este fenómeno foi estudado por Turnbull et al. (2016) en *P. aeruginosa* e detectouse unha endolisina profágica esencial

para que este ocorra que está codificada polo xene *lys*, localizado dentro dun grupo de xenes codificadores de piocinas tipo R e F (Turnbull et al., 2016; Yu et al., 2018). Este grupo de xenes ou “clúster” pertence ao xenoma accesorio polo que non está presente en todas as cepas de *P. aeruginosa* (Turnbull et al., 2016). Grazas a microscopia de súper resolución de células vivas confirmouse que este mecanismo colabora na bioxénese e no empaquetado da carga das vesículas. Aínda que o empaquetado probablemente sexa impreciso podería explicar a presenza de material xenético (ADN, ARN) e de proteínas citoplasmáticas dentro das OMVs (Turnbull et al., 2016). Recentemente estudouse este mecanismo en *E. coli*, e grazas á visualización en microscopio de súper resolución de células vivas púidose comprobar que os fagos líticos T4 e T7 que infectaban a bacteria, inducían a formación de vesículas ben por lise celular explosiva, ben por avultamento da membrana. As características das vesículas formadas por lise celular explosiva coincidían coas atopadas en *P. aeruginosa*. A pesar de que se descoñece boa parte do que conforma o mecanismo, se sabe que os fagos participan na lise celular explosiva e no aumento xeral da abundancia de OMVs (Mandal et al., 2021).

#### 4.2. Modelos de formación en Gram positivas

As vesículas de membrana de bacterias Gram positivas careceron do foco de interese dos investigadores debido a grosa capa de peptidoglicano da súa parede celular que se consideraba que actuaba como unha barreira impedía a súa liberación (Brown et al., 2015; Jeong et al., 2022). Propuxéronse tres hipóteses non excluíntes para a liberación das vesículas (Brown et al., 2015): por acción da presión de turgencia, das encimas modificadoras da parede celular e de canais de proteínas (Cao & Lin, 2021). A presión de turgencia pode axudar a atravesar a grosa parede celular pero depende do tamaño dos poros ou do grosor da parede celular. As encimas modificadoras, como as proteasas, poden afrouxar a parede facilitando o paso das MVs. Estas encimas atopáronse en bacterias Gram positivas e en fungos, que presentan unha parede de características semellantes. Os canais de membrana tamén lles axudan a atravesar a capa de peptidoglicano e é probable que a modificación polas proteasas permita as MV atravesar canais de diámetro menor que o seu (Brown et al., 2015).

Nun estudo recente de microscopía de reconstrución óptica estocástica (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM) para obter imaxes de súper resolución (Jeong et al., 2022), puidéronse esclarecer certos aspectos da produción das MVs e propuxéronse outros 3 modelos de formación de vesículas en Gram positivas (figura 2).



**Figura 2:** Modelos de formación das vesículas de Gram positivas. Imaxe recuperada de Jeong et al., 2022.

Un aspecto importante, que se relaciona coas hipóteses anteriores, é a confirmación da degradación da parede celular por encimas antes da liberación das MVs. Polo tanto, todos os mecanismos están regulados pola acción destas encimas. Dous dos modelos liberan as vesículas por formación de ampolas ou avultamento da membrana e neles participan precursores de MVs que se localizaban na rexión da parede interna antes da liberación das vesículas. No primeiro modelo os precursores liberábanse a través dos poros da parede celular mentres que no segundo liberábanse formando ampolas. Isto dá lugar a vesículas con dobre capa, unha de membrana citoplasmática e outra de peptidoglicano. Este mecanismo é menos frecuente pero pénsase que esta capa extra podería axudarlles ás vesículas, por exemplo, protexéndoas da lise osmótica ao actuar como barreira física fronte a entrada de auga. O último modelo proposto é común coa bioxénese das OMVs, trátase da lise celular

explosiva. Se observa unha expansión na zona interna da envoltura antes da explosión que posiblemente se deba á presión osmótica pola degradación da parede. A parede bacteriana termina cedendo e producindo fragmentos de membrana que se circularizan formando MVs de tamaño algo máis grandes que as formadas polo primeiro modelo. Por último, tamén se descubriu que as MVs producidas por lise celular explosiva contiñan enterotoxina B como factor de virulencia (Jeong et al., 2022).

### 4.3. Factores de regulación

A taxa de produción de vesículas vese afectada por múltiples factores ambientais, xenéticos e polo estrés celular (Aytar-Çelik et al., 2022; Briaud e Carroll, 2020; Ellis e Kuehn, 2010).

#### 4.3.1. Factores ambientais

A temperatura é un dos factores ambientais que aumenta a taxa de formación de vesículas (Kulp e Kuehn, 2010; Sartorio et al., 2021; Yu et al., 2018). En xeral, as altas temperaturas conducen a un aumento de proteínas desnaturalizadas o que fai que as membranas sexan máis fluídas facilitando a formación e liberación das OMVs, como sucede por exemplo en *E.coli* (Kulp e Kuehn, 2010; Schwechheimer e Kuehn, 2015; Yu et al., 2018). Porén, non sempre é así, en *Pseudomonas* o aumento prodúcese máis preto dos 12°C que dos 14°C e noutras bacterias como a *Shewanella livingstonensis*, que está adaptada ás baixas temperaturas ou *Bartonella henselae* activan a formación de OMVs coas baixas temperaturas (Schwechheimer e Kuehn, 2015).

A dispoñibilidade de nutrientes é outro factor importante e o seu efecto depende da especie (Yu et al., 2018). É posible que as vesículas liberen encimas que axuden a transformar os nutrientes do medio en formas nas que os poida captar a bacteria (Kulp e Kuehn, 2010). Por exemplo, *Pseudomonas fragi* libera máis vesículas cando o medio que o rodea é rico en nutrientes (Yu et al., 2018). Polo contrario, cando o ferro é limitado *Mycobacterium tuberculosis* libera MVs cheos de sideróforos que o poidan capturar (Brown et al., 2015; Schwechheimer e Kuehn, 2015). Outros organismos que aumentan a liberación de vesículas cando o ferro é limitado son *H. influenzae*, *V. cholerae* e *E.coli*; pero non só é o ferro, o

sulfato reducido causa o mesmo efecto en *Neisseria meningitidis* (Sartorio et al., 2021).

#### 4.3.2. Estrés celular

O estrés é causado por distintas fontes como antibióticos ou factores físicos como a presión osmótica pero tamén por procesos como a infección, en caso de patóxenos, ou a propia división celular. Os antibióticos poden incrementar a abundancia de vesículas ao danar o ADN como, por exemplo, a gentamicina en *P. aeruginosa* (Ellis e Kuehn, 2010; Yu et al., 2018). En *Pseudomonas putida*, tanto a presión osmótica, o choque térmico como concentracións tóxicas de alcohol de cadea longa ou quelantes de ferro como o EDTA aumentan a liberación de OMVs. Durante a división celular, debido ó alto recambio de peptidoglicano da parede celular fórmanse máis vesículas para conseguir eliminar o material sobranante (Yu et al., 2018).

#### 4.3.3. Factores xenéticos

Nas bacterias Gram negativas, o estrés da envoltura activa a vía Sigma E ( $\sigma E$ ) que regula a alza a vesiculación (Ellis e Kuehn, 2010; Kulp e Kuehn, 2010). Este sistema aumenta a expresión de xenes que codifican para chaperonas periplásmicas e proteasas que eliminan as proteínas mal pregadas da membrana (Kulp e Kuehn, 2010). O sistema Sigma E tamén regula un ARN pequeno (sRNA) de *V. cholera*, VrrA, e o homólogo MicA en *E. coli*. Estes ARNs reducen a expresión da porina OmpA o que aumenta a produción de OMVs (Kulp e Kuehn, 2010; Sartorio et al., 2021). Tamén se atoparon homólogos destes ARNs en *Salmonella*, *Yersinia pestis* y *Klebsiella pneumoniae* (Kulp e Kuehn, 2010). Outros mecanismos reguladores relacionados cos modelos explicados anteriormente son, o sistema de dous compoñentes PhoPQ que activa a encima PagL, responsable da desacilación dos lípidos A en *S. typhimurium*, (Elhenawy et al., 2016) e da resposta SOS dependente de RecA que modula o xene *lys*, involucrado na lise celular explosiva, en presenza de factores de estrés exógenos e endógenos en *P. aeruginosa* (Turnbull et al., 2016). A importancia da regulación xenética na formación das OMVs demostrouse nun estudo en *E. coli* no cal descubriuse a participación de ata case 150 xenes (Yu et al., 2018).

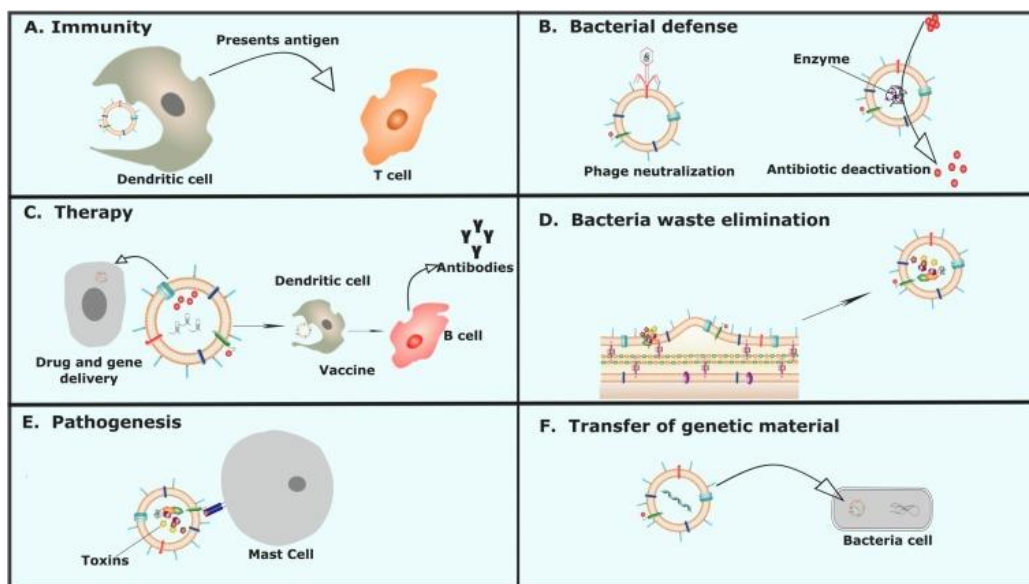
Nas bacterias Gram positivas os determinantes xenéticos son menos coñecidos. *Listeria monocytogenes* contén o xen *sigB*, que codifica o factor  $\sigma^B$  da ARN polimerasa, que regula: os xenes encargados da supervivencia durante o estrés celular; a expresión da proteína internalina B (InlB), necesaria para a invasión bacteriana e o factor regulador positivo A (PrfA), que controla a biosíntese da toxina hemolítica listeriolisina O (LLO) (Brown et al., 2015). Para comprobar a súa función estudouse un mutante sen este factor,  $\Delta sigB$ , e observouse que as vesículas estaban deformadas e, mediante a cuantificación de proteínas, o número de vesículas ou ben o número de proteínas por vesícula tamén se reducían (Briaud e Carroll, 2020; Brown et al., 2015). Outro caso coñecido é o de *M. tuberculosis* que posúe o xene *virR* que participa na modulación do sistema inmune do hóspede e na formación das MVs (Brown et al., 2015; Schwechheimer e Kuehn, 2015). Parece que a proteína VirR contén un dominio relacionado coa familia LytR que colabora na formación da parede celular e na resposta ao estrés polo que é moi probable que regule a bióxénese das vesículas (Brown et al., 2015).

## 5. Funcións das vesículas bacterianas

A liberación das vesículas permite a comunicación intercelular e co entorno das bacterias, incluso a longa distancia, e así evita o gasto enerxético do seu desprazamento (Aytar-Çelik et al., 2022; Briaud e Carroll, 2020; Furuyama e Sircili, 2021; Kulp e Kuehn, 2010). Antes de descubrir o papel das vesículas, coñecíanse seis tipos de secreción de proteínas que se clasificaban pola presenza ou non da molécula sinal Sec (Lee et al., 2008). Sen embargo, as OMVs supoñen un novo tipo nas Gram negativas no cal se libera material insoluble que pode estar acompañado ou no de material soluble. O material insoluble pode incluír proteínas, lípidos, toxinas, complexos inmunomoduladores, entre outras bio-moléculas (Aytar-Çelik et al., 2022; Jan, 2017; Kulp e Kuehn, 2010). Isto proporciona protección fronte encimas daniñas, como proteasas, ou da hidrofobia do medio. Tamén permite liberar proteínas en altas concentracións ou secretar conxuntamente distintas proteínas que actúan na mesma actividade (Aytar-Çelik et al., 2022; Briaud e Carroll, 2020; Furuyama e Sircili, 2021; Kulp e Kuehn, 2010; Sartorio et al., 2021). A diversa natureza da



carga permite intuír sobre as diferentes funcións que realizan (Cao e Lin, 2021; Jan, 2017).



**Figura 3:** Exemplos de funcións das vesículas bacterianas. Imaxe recuperada de Aytar-Çelik et al., 2022.

### 5.1. Adquisición de nutrientes

As OMVs contribúen na adquisición de nutrientes, ben transportando encimas específicos ou ben, transportando o propio nutriente de interese á célula. No primeiro caso, encimas como proteasas ou glicosidasas, encárganse de degradar os nutrientes en moléculas máis simples e accesibles para a bacteria (Furuyama e Sircili, 2021; Jan, 2017; Kulp e Kuehn, 2010; Sartorio et al., 2021; Schwechheimer e Kuehn, 2015; Yu et al., 2018). No segundo caso, as OMVs axudan na captación de nutrientes esenciais como poden ser os ións metálicos. Para iso son necesarios proteínas ou moléculas que se unan a estes e sexan capaces de envialos ate a bacteria (Furuyama e Sircili, 2021; Kulp e Kuehn, 2010; Schwechheimer e Kuehn, 2015; Yu et al., 2018). Por exemplo, a quinolona sinal de *Pseudomonas* (PQS) é capaz de unirse ao ferro e forma un complexo actuando como un sideróforo. Este complexo pode fusionarse coa membrana externa e introducir o ferro directamente na bacteria ou pode liberalo nas súas proximidades para que a bacteria o absorba (Kulp e Kuehn, 2010; Schwechheimer e Kuehn, 2015; Yu et al., 2018). Aínda que a captación de ferro é o máis coñecido observouse OMVs enriquecidas en proteínas para a

adquisición de zinc en *N. meningitidis* (Schwechheimer e Kuehn, 2015; Yu et al., 2018). Ademais, as OMVs poderían servir por si mesmas como fontes de carbono e nitróxeno, procedentes dos seus compoñentes a outras bacterias como por exemplo as cianobacterias do xénero *Prochlorococcus* en favor das proteobacterias dos xéneros *Alteromonas* e *Halomonas* (Jan, 2017; Yu et al., 2018).

## 5.2. Homeostase e defensa

Unha das funcións máis importantes das vesículas está relacionada coa estrutura da que derivan, a envoltura celular. A envoltura é esencial para a supervivencia da bacteria e as OMVs/MVs colaboran na homeostase celular (Cao e Lin, 2021; Kulp e Kuehn, 2010; Schwechheimer e Kuehn, 2015). Por esta razón se incrementa o número de OMVs ante factores de estrés tanto internos coma externos. As vesículas eliminan a acumulación de proteínas sobre expresadas ou mal pregadas na membrana e outros materiais tóxicos derivados do estrés como tamén impide a entrada de bacteriofagos ou antibióticos, (figura 3 B e D) (Kulp e Kuehn, 2010; Yu et al., 2018).

Para facer fronte a infección, a bacteria libera vesículas que, ao compartiren a estrutura da membrana, poden actuar como cebo e ocupar os receptores do fago e diminuír así a posibilidade de infección da bacteria produtora (Aytar-Çelik et al., 2022; Yu et al., 2018). Por exemplo, nun estudo con OMVs de *E.coli* e fagos T4, observouse como se unían de forma irreversible impedindo este último chegara a bacteria (Aytar-Çelik et al., 2022).

No caso dos antibióticos as bacterias presentan dous mecanismos de defensa. Poden reducir a cantidade de antibiótico que chega ata a bacteria ou ben poden degradalo (Sartorio et al., 2021). No primeiro mecanismo, as vesículas poden actuar igual ca no caso dos fagos e secuestralo do medio (Cao e Lin, 2021; Sartorio et al., 2021) ou poden unirse a el e eliminalo da bacteria mediante bombas de efluxo para múltiples fármacos (Jan, 2017). Así, as OMVs de *E. coli* reduciron os antibióticos colistina e melitina do medio extra-celular, que atacan as membranas celulares, mentres que non xurdiron efecto en antibióticos con outro modo de acción, como a ciprofloxacina, estreptomina ou a trimetoprina (Sartorio et al., 2021).

No segundo mecanismo, as vesículas poden degradar estes axentes grazas as encimas que transportan no seu interior, como as  $\beta$ -lactamasas das MVs de *S. aureus* para eliminar a ampicilina do medio (Liu et al., 2018; Yu et al., 2018; Villageliu & Samuelson, 2022). Ambos métodos protexen tanta ás bacterias produtoras de vesículas como as bacterias circundantes (Yu et al., 2018; Sartorio et al., 2021; Villageliu e Samuelson, 2022).

### 5.3. Transporte de factores de virulencia

As vesículas de bacterias patóxenas transportan no seu interior diversos factores de virulencia necesarios para colonización do hóspede (Furuyama e Sircili, 2021; Kulp e Kuehn, 2010; Sartorio et al., 2021) como adhesinas. As adhesinas son proteínas encargadas da adhesión ao tecido do hóspede (Ellis e Kuehn, 2010; Jan, 2017; Kulp e Kuehn, 2010). Están presentes tanto nas bacterias como nas vesículas polo que deben ser distintas para evitar a competencia entre elas (Schwechheimer e Kuehn, 2015). Isto fai que as bacterias non sexan eliminadas por procesos físicos e que as vesículas liberen o seu contido no tecido axeitado (Jan, 2017). Outros factores facilitan a invasión e a expansión polos tecidos do organismo como as invasinas e as toxinas (figura 3 E). Estas últimas teñen efecto citotóxico, permiten propagar o efecto a longa distancia e algunhas segréganse preferentemente a través das vesículas xa que son máis activas que na forma soluble, como por exemplo a enterotoxina termolábil de *E. coli* (Aytar-Çelik et al., 2022; Ellis e Kuehn, 2010; Jan, 2017; Lee et al., 2008; Villageliu e Samuelson, 2022). Outros actúan sobre a resposta inmune do organismo como por exemplo os patróns moleculares asociados a patóxenos bacterianos (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) que interactúan cos receptores de recoñecemento de patróns do hóspede (patterns recognition receptors, PRRs) (figura 3 A). Un exemplo da acción destas moléculas é unha proteína de unión a inmunoglobulina D de *Moraxella catarrhalis* que as OMVs entregan ás células B para aumentar a produción de IgM e retrasar a produción de anticorpos específicos (Schwechheimer e Kuehn, 2015).

#### 5.4. Biopelículas e transferencia de xenes

As biopelículas son agrupacións bacterianas que se adhíren a unha superficie, xa sexa abiótica ou biótica, e se incrustan dentro dunha matriz auto-producida de substancia poliméricas (Gupta et al., 2016; Vestby et al., 2020). Estas comunidades poden ser tanto heteroxéneas como homoxéneas (Gupta et al., 2016). As vesículas estimulan a súa produción grazas ao ADN extracelular e as adhesinas que transportan (Brown et al., 2015; Cao e Lin, 2021; Furuyama e Sircili, 2021; Gupta et al., 2016; Kulp e Kuehn, 2010; Vestby et al., 2020). No caso de *P. aeruginosa*, tamén colabora a quinolona (PQS) na agregación e na comunicación dentro da poboación (Aytar-Çelik et al., 2022; Ellis e Kuehn, 2010). As biopelículas aumentan a resistencia das bacterias fronte os antibióticos e o sistema inmune do hóspede favorecendo as infeccións crónicas persistentes. De feito, as citoquinas liberadas polo sistema inmune contra a biopelículas aceleran os danos dos tecidos veciños (Gupta et al., 2015; Vestby et al., 2020).

As vesículas permiten a propagación de resistencia aos antibióticos entre as bacterias que conforman estas comunidades (Furuyama e Sircili, 2021; Jan, 2017; Kulp e Kuehn, 2010; Villageliu e Samuelson, 2022), especialmente nas heteroxéneas (Aytar-Çelik et al., 2022; Lee et al., 2008; Schwechheimer e Kuehn, 2015). Estase a considerar as vesículas como un novo mecanismo de transferencia horizontal de xenes entre especies, tanto Gram negativas coma positivas (figura 3 F) (Aytar-Çelik et al., 2022; Briaud e Carroll, 2020; Brown et al., 2015; Villageliu e Samuelson, 2022). A evidencia deste fenómeno probouse na transmisión da  $\beta$ -lactamasa de cepas de *Acinetobacter baylyi* en células receptoras de *E.coli* DH5 $\alpha$  (Aytar-Çelik et al., 2022; Schwechheimer e Kuehn, 2015).

## 6. Conclusións/Conclusiones/Conclusions

### Conclusións

A vesiculación bacteriana é frecuente pero en Gram positivas é menos coñecida que en Gram negativas.

Existen varios modelos de bioxénese pero ningún é xenérico. En Gram negativas o modelo de acumulación de fosfolípidos na membrana externa parece un bo candidato para ser un modelo xeral. En canto as Gram positivas, a aplicación de

novas técnicas de microscopía de reconstrución óptica estocástica permite propoñer tres modelos, confirmando que o proceso está regulado pola acción de encimas que degradan a parede celular.

As vesículas bacterianas teñen múltiples funcións destacando a comunicación, o transporte, a adquisición de nutrientes, a homeostase ou a formación de biopelículas.

Ademais, en bacterias patóxenas son importantes na colonización dos hóspedes e na resistencia fronte o sistema inmunolóxico ou os antibióticos.

### Conclusiones

La vesiculación bacteriana es frecuente, pero en Gram positivas es menos conocida que en Gram negativas.

Existen varios modelos de biogénesis pero ninguno es genérico. En Gram negativas el modelo de acumulación de fosfolípidos en la membrana externa parece un buen candidato para ser un modelo general. En cuanto a las Gram positivas, la aplicación de nuevas técnicas de microscopía de reconstrución óptica estocástica permite proponer tres modelos, confirmando que el proceso está regulado por la acción de encimas que degradan la pared celular.

Las vesículas bacterianas tienen múltiples funciones destacando la comunicación, el transporte, la adquisición de nutrientes, la homeostase o la formación de biopelículas.

Además, en bacterias patógenas son importantes en la colonización de los huéspedes y en la resistencia frente al sistema inmunológico o los antibióticos.

### Conclusions

Bacterial vesiculation is common, but in Gram positive cases it is less known than in Gram negative cases.

There are several models of biogenesis but none is generic. In Gram negative cells, the model of phospholipid accumulation in the outer membrane seems a good candidate to be a general model. Regarding Gram positive cells, the application of new stochastic optical reconstruction microscopy techniques allows

us to propose three models, confirming that the process is regulated by the action of enzymes that degrade the cell wall.

The functions performed by vesicles are more established. Its secretion favours communication, the acquisition of nutrients or the transport of biomolecules, among others.

In addition, in pathogenic bacteria they are important in the colonization of the hosts and in the resistance against the immune system or antibiotics.

## 7. Referencias

- Aytar Çelik, P., Derkuş, B., Erdoğan, K., Barut, D., Blaise Manga, E., Yıldırım, Y., Pecha, S., e Çabuk, A. (2022). Bacterial membrane vesicle functions, laboratory methods, and applications. *Biotechnology Advances*, 54, 107869. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107869>
- Briaud, P., e Carroll, R. K. (2020). Extracellular vesicle biogenesis and functions in Gram-positive bacteria. *Infection and Immunity*, 88(12), e00433-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00433-20>
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., e 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>
- Cao, Y., e Lin, H. (2021). Characterization and function of membrane vesicles in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(5) 1795–1801. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11140-1>
- Elhenawy, W., Bording-Jorgensen, M., Valguarnera, E., Haurat, M. F., Wine, E., e Feldman, M. F. (2016). LPS remodeling triggers formation of outer membrane vesicles in *Salmonella*. 7(4), e00940-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00940-16>
- Ellis, T. N., e Kuehn, M. J. (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 81–94. <https://doi.org/10.1128/mubr.00031-09>
- Furuyama, N., e Sircili, M. P. (2021). Outer membrane vesicles (OMVs) produced by Gram-negative bacteria: Structure, functions, biogenesis and vaccine application. *BioMed Research International*, 2021, 1490732. <https://doi.org/10.1155/2021/1490732>
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., e Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—A journey to break the wall: A review. *Archives of Microbiology*, 198(1) 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>

- Hayashi, J., Hamada, N., e Kuramitsu, H. K. (2002). The autolysin of *Porphyromonas gingivalis* is involved in outer membrane vesicle release. *FEMS Microbiology Letters*, 216(2), 217–222. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11438.x>
- Jan, A. T. (2017). Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative bacteria: A perspective update. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01053>
- Jeong, D., Kim, M. J., Park, Y., Chung, J., Kweon, H. S., Kang, N. G., Hwang, S. J., Youn, S. H., Hwang, B. K., e Kim, D. (2022). Visualizing extracellular vesicle biogenesis in Gram-positive bacteria using super-resolution microscopy. *BMC Biology*, 20, 270. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01472-3>
- Kulp, A., e Kuehn, M. J. (2010). Biological Functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual Review of Microbiology*, 64, 163–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>
- Lee, E. Y., Choi, D. S., Kim, K. P., e Gho, Y. S. (2008). Proteomics in Gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrometry Reviews*, 27(6), 535–555. <https://doi.org/10.1002/mas.20175>
- Liu, Y., Defourny, K. A. Y., Smid, E. J., e Abee, T. (2018). Gram-positive bacterial extracellular vesicles and their impact on health and disease. *Frontiers in Microbiology*, 9, 01502. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01502>
- Mandal, P. K., Ballerin, G., Nolan, L. M., Petty, N. K., e Whitchurch, C. B. (2021). Bacteriophage infection of *Escherichia coli* leads to the formation of membrane vesicles via both explosive cell lysis and membrane blebbing. *Microbiology*, 167(4), 001021. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001021>
- 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., e Schild, S. (2016). A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nature Communications*, 7, 10515. <https://doi.org/10.1038/ncomms10515>
- Sartorio, M. G., Pardue, E. J., Feldman, M. F., e Haurat, M. F. (2021). Bacterial outer membrane vesicles: From discovery to applications. *Annual Review of Microbiology*, 75, 609–630. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-052821-031444>
- Schwechheimer, C., e 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>
- 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., e Whitchurch, C. B. (2016). Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nature Communications*, 7, 11220. <https://doi.org/10.1038/ncomms11220>
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., e Nesse, L. L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9(2), 59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>
- Villageliu, D. N., e Samuelson, D. R. (2022). The role of bacterial membrane vesicles in human health and disease. *Frontiers in Microbiology*, 13, 828704. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.828704>
- Willey, J. M., Sandman, K. M., e Wood, D. H. (2023). *Prescott's Microbiology* (12a. ed.). McGrawHill
- Xue, K., Wang, L., e Liu, J. (2022). Bacterial outer membrane vesicles and their functionalization as vehicles for bioimaging, diagnosis and therapy. *Materials Advances*, 3(19) 7185–7197. <https://doi.org/10.1039/d2ma00420h>
- Yu, Y., Wang, X. H., e Fan, G. C. (2018). Versatile effects of bacterium-released membrane vesicles on mammalian cells and infectious/inflammatory diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(4) 514–533. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.82>