

УДК 579

М. А. Малкова, Л. Г. Дудина, Д. А. Девришов, А. А. Бывалов

ВЕЗИКУЛООБРАЗОВАНИЕ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В обзоре представлены данные литературы об относительно новом феномене современной микробиологии – везикулообразовании грамотрицательных бактерий. Везикулообразование является естественным физиологическим процессом для многих исследованных на сегодняшний день грамотрицательных бактерий. Способность к образованию везикул, в целом, обеспечивает адаптационную устойчивость бактерий к меняющимся условиям окружающей среды. Целью данного обзора являлось обобщение имеющейся информации об этом явлении для дальнейшего использования в экспериментальных исследованиях, направленных на изучение биологической значимости везикулообразования. Приведена краткая информация об истории открытия этого явления, о механизмах и условиях образования, химическом, биохимическом составе везикул. Отдельно рассмотрены вопросы, касающиеся функциональной значимости везикулообразования грамотрицательными бактериями, как механизмов обеспечения защиты микроба от внешних воздействий биотической и абиотической природы и как наступательного оружия в борьбе с макроорганизмом.

Ключевые слова: грамотрицательные бактерии, везикулообразование, везикулы наружной мембраны.

В ходе эволюции микроорганизмы вынуждены постоянно приспосабливаться к изменяющимся условиям существования с помощью различных инструментов взаимодействия с окружающей средой. Одним из таких адаптационных инструментов является и широко распространенный среди грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также архей процесс везикулообразования [1].

Везикулы наружной мембраны (ВНМ) секретируются на всех стадиях роста микроорганизма в естественных условиях [2]. ВНМ освобождаются из бактериальной поверхности, не нарушая ее целостности, и представляют собой наноструктуры размером 10 – 300 нм, состоящие из, как правило, сферически замкнутого мембранного слоя с заключенным внутри содержимым периплазматического пространства [3].

Долгое время везикулы принимали за клеточные артефакты [3]. Поэтому, несмотря на то, что первые сообщения о везикулах появились около полувека назад [4], основной период их изучения приходится на два последних десятилетия. За это время описаны разнообразные физиологические функции ВНМ, вместе с тем четкого представления о механизме формирования везикул и регуляции этого процесса до сих пор нет [5].

Рост устойчивости бактерий к имеющимся противомикробным препаратам при тенденции снижения интенсивности разработки новых [6] обуславливает необходимость всестороннего изучения процесса везикулообразования.

История открытия везикул

ВНМ первоначально были обнаружены в виде растворимых липополисахаридов (ЛПС) в бесклеточной надосадочной жидкости после выращивания культуры *Escherichia coli* в лизин-лимитирующих условиях [7]. Проведя электронно-микроскопические исследования этой культуры, ученые предположили, что недостаток лизина ингибирует синтез пептидогликана клеточной стенки, не нарушая при этом синтеза наружной мембраны, избытки которой и отделяются в виде небольших сферических структур с электронно-плотным центром [4]. Однако в дальнейшем аналогичные структуры были обнаружены у различных видов грамотрицательных бактерий при нормальных условиях роста в пробирке, а также в инфицированных тканях и сыворотке крови человека [8]. Только спустя почти 20 лет было высказано предположение об образовании везикул у грамположительных бактерий *Clostridium thermosulfurogenes* под действием высоких концентраций α -амилазы и

пуллулаказы. Однако эти ферменты приводят к частичной дезинтеграции клеточной мембраны и появлению в культуральной жидкости ее фрагментов, которые, вероятнее всего, были ошибочно приняты за везикулы [9]. Позднее исследователи наблюдали продукцию ВМ многими грамположительными бактериями, например, *Bacillus subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus* и *Mycobacterium ulcerans*, без корреляции между ферментативной активностью и нестабильностью клеточной стенки [10].

К настоящему времени выявлено, что некоторые представители архей (*Sulfolobus*, *Thermococcus*) также продуцируют везикулы [1].

Механизмы формирования везикул

Способность к образованию везикул показана для многих видов изученных на сегодняшний день грамотрицательных бактерий [11]. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий состоит из наружной и внутренней мембран, разделенных пространством периплазмы с тонким слоем пептидогликана (ПГ) [12]. Везикулообразование осуществляется путем выпячивания НМ и последующего ее отделения в виде структур сферической или овоидной формы с электронно-плотной внутренней областью, как показано на рисунке.



Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение формирующихся везикул (указано стрелкой) на поверхности клеток *Pseudomonas aeruginosa*, 250нм [13]

Несмотря на то, что согласованных доказательств существования определенного механизма формирования ВМ нет, все же возможно систематизировать предположения, объясняющие данный процесс. С

уверенностью можно сказать об отсутствии корреляций между везикуляцией и бактериальным лизисом или мембранной нестабильностью [14]. Так, везикулы образуются в местах отсутствия белков (OmpA), связывающих наружную мембрану с пептидогликаном или в местах расщепления амидных связей ПГ [11]. Это может произойти, например, под влиянием антибиотиков или ферментов аутолизинов (эндопептидаз и трансгликозидаз) [15]. В результате накапливаются неправильно свернутые белки и экспрессируются другие белки периплазмы в избыточном количестве. Белки собираются на внутренней поверхности НМ и создают давление, тем самым вызывая формирование выпуклости, которая растет до определенной кривизны мембраны. Однако критического порога кривизны, по всей вероятности, не существуют, что обосновано различием размеров везикул [11]. Формированию ВНМ, кроме того, может способствовать взаимное отталкивание отрицательно заряженных соседних молекул ЛПС на поверхности клеток [16] и изменение генетической регуляции [14]. Неясным остается механизм дальнейшего отсоединения везикул от НМ [11].

Состав везикул

Биохимический анализ ВНМ показал, что основными компонентами мембраны везикул являются липополисахариды, белки и фосфолипиды (фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерол) наружной мембраны продуцирующих их бактерий [11]. Среди белков преобладают порины, адгезины, а также ферменты (фосфолипазы, протеазы) и флагеллин (у жгутиковых бактерий), участвующие во взаимодействиях с клетками-«мишенями» [2].

Внутреннее содержимое ВНМ является целенаправленным «грузом» клетки и может включать: 1) периплазматические белки, такие как токсины (например, цитолизин А *E. coli*, холерный токсин *Vibrio cholerae*, цитотоксин *Helicobacter pylori*) и ферменты (протеаза, уреаза, щелочная фосфатаза), являющиеся наравне с ЛПС мембраны основными факторами вирулентности; 2) цитоплазматические элементы, например, шапероны, ферменты, ДНК и РНК [5]. Производство везикул требует определенных затрат энергии, однако,

периплазматическое пространство является окислительной средой, лишенной энергетических источников, поэтому коферменты АТФ и NADPH, вероятно, поступают из цитоплазмы [11].

Состав везикул часто отличается от состава НМ и периплазмы бактерии. Например, значительная часть белков НМ *H. pylori* (77%) обнаружена в ВНМ, при этом белки, содержащиеся в НМ в большом количестве, в ВНМ не найдены [17], а у энтеропатогенов в везикулах содержится примерно в 10 раз больше олигомерных цитотоксичных белков С1уА, чем в периплазме [18]. На основании этого высказано предположение о выборочном и/или специфическом механизме формирования ВНМ, который является более регулируемым, чем спонтанным. Так, упаковка компонентов в везикулы может происходить на стадии биогенеза клеточной оболочки, либо в результате включения/удаления нового мембранного материала (ЛПС, белки) [2].

Условия формирования везикул

Формирование везикул происходит как в разнообразных естественных условиях, так и в планктонных и поверхностных лабораторных культурах, биопленках и при попадании патогенных микроорганизмов в тело хозяина [19]. Выпуск ВНМ зависит от фазы роста бактерий. Одни, например, *Salmonella typhimurium* и *Borellia*, секретируют большее количество везикул в экспоненциальной фазе, другие, *Neisseria meningitides* и *Francisella* – в стационарной [5, 20].

Интенсивность производства везикул и их состав различаются у разных видов бактерий. Например, в везикулы *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* при нормальных условиях выращивания уходит около 1% материала наружной мембраны, в то время как у *Neisseria meningitidis* – 8-12% [20, 21, 22]. Неоднородность везикулообразования, белкового и липидного состава наблюдается и в пределах одного вида бактерий в зависимости от условий окружающей среды и общего метаболического состояния клетки, а также у штаммов, выращенных в нормальных и стрессовых условиях [2].

Производство везикул увеличивается во время бактериального стресса. Воздействие стрессорных факторов приводит к накоплению в периплазматическом пространстве неправильно свернутых белков (в том числе токсичных для клетки), которые удаляются в виде везикул, что повышает выживаемость бактерий [2]. Имеется несколько работ, подтверждающих участие везикуляции в борьбе со стрессом с помощью специализированных систем реакций. Например, у *E. coli* таковой является σ^E -путь [23].

К основным стрессовым факторам, изменяющим уровень везикулообразования, относятся: температура, питательные вещества, антибиотики, бактериофаги и генетические мутации.

1) Влияние **температуры** видоспецифично. Например, у *E. coli* (как и у многих грамотрицательных бактерий) при повышении температуры с 30°C до 37°C увеличивается выход везикул. Вероятнее всего, это связано с изменением текучести и искривлением мембраны [24]. В случае *P. aeruginosa*, повышение температуры не влияет на уровень везикуляции, в то время как у приспособленных к холоду бактерий *Shewanella livingstonensis* и *Serratia marcescens* к увеличению продукции ВНМ приводили более низкие температуры [25]. У *Yersinia pestis* температура 37°C способствует большему везикулообразованию, нежели оптимальная для роста – 26°C, а дальнейшее воздействие на 37°C-ую культуру холодового шока только усиливает этот процесс [26].

2) Наличие **питательных веществ** также может вызывать противоположные эффекты. Так, например, повышение уровня везикул у *Lysobacter* происходит при росте на обедненных средах, а у *Pseudomonas* – на богатых мясных средах [27]. Более интенсивный выпуск ВНМ характерен при недостатке в среде цистеина (*N. Meningitidis*) [20] или при добавлении гексадекана (*Acinebacter*), глюкозы (*Y. pestis*), карбоната калия (*V. cholerae*) [5].

3) Увеличение везикулообразования происходит при добавлении **антибиотика**, который разрушает связи в клеточной стенке, тем самым

способствуя накоплению неправильно свернутых белков. Например, при концентрации гентамицина 0,6% выход ВНМ у *P. aeruginosa* увеличивается примерно в 3 раза [3].

4) В присутствии специфичного **бактериофага** *E. coli* увеличивает выпуск везикул, а количество фага при этом уменьшается примерно на 90%, что, возможно, связано с инактивацией фага после ошибочного прикрепления к ВНМ, а не к самой клетке. Механизм, благодаря которому бактерии узнают о появлении фага и реагируют выбросом везикул, не известен [28].

5) **Генетические мутации** могут происходить в генах: участвующих в производстве ВНМ, кодирующих мембранные белки, отвечающих за сверхэкспрессию белков, кодирующих ферменты гидролиза пептидогликана [2].

Кроме того уровень производства везикул патогенными бактериями может увеличиваться во время развития инфекционного процесса [19].

Функции везикул

Не смотря на отсутствие полного понимания механизмов везикулообразования, роль ВНМ достаточно глубоко изучена. Компонентный состав везикул обуславливает проявление следующих функций:

1) Секреция везикул позволяет бактериям, не расходуя энергию на свое продвижение, участвовать в межклеточной и межвидовой коммуникации. Таким образом, ВНМ выступают в качестве средства доставки растворимых и нерастворимых бактериальных продуктов, например факторов вирулентности, обеспечивая их защиту от протеаз и агрессивной среды [29].

2) Участие в горизонтальном переносе генов между различными штаммами и даже видами. Вероятность этого увеличивается при попадании во внутреннее пространство ВНМ ДНК бактерии или бактериофага. ВНМ могут легко сливаться с клетками-«мишенями» [13].

3) Многие белки, ассоциированные с везикулами, участвуют в инвазии и прикреплении к эукариотическим клеткам хозяина, вызывают иммунный ответ [30].

4) ВНМ могут обеспечивать питание микроорганизмов, утилизацию токсичных соединений и хранение полезных веществ [11].

5) Везикулы обеспечивают выживаемость клеток в стрессовых условиях: экстремальная температура, дефицит питательных веществ, действие антибиотиков, бактериофагов и других противомикробных агентов. Мембрана везикул практически полностью идентична НМ бактерий, поэтому является «приманкой» для антибиотиков и фагов [2].

6) ВНМ участвуют в лизисе других бактерий [15].

7) Везикулы способны защитить бактерию от иммунного ответа хозяина, а также сохранять факторы вирулентности в стрессовой среде во время инфекции [2, 19].

8) Они участвуют в формировании бактериальных сообществ – биопленок, тем самым увеличивая выживаемость бактерий [2].

Подводя итог, можно сказать, что везикулообразование является как защитным механизмом бактерий, обеспечивающим выживаемость в стрессовых условиях, так и инфекционным, способствующим распространению факторов вирулентности в организме хозяина, т.е. это орудие и защиты и нападения микроорганизмов.

Знания механизмов и функций везикулообразования уже активно используются для совершенствования средств и методов инфекционной медицины. Адгезивные и инвазивные свойства ВНМ могут быть применены для специфической доставки терапевтических или профилактических средств к клеткам хозяина [31]. Иммуногенные свойства ВНМ способствуют развитию гуморального и Т-клеточного иммунитета, что важно при создании вакцин [5]. Кроме того, возможно предотвращение образования везикул патогенами или ослабление эффективности воздействия ВНМ для уменьшения патогенности возбудителя [19].

Список литературы

1. *MacDonald I. A., Kuehn M. J.* Offense and Defense: Microbial Membrane Vesicles Play Both Ways // *Research in microbiology*. 2012. V. 163 (9-10). P. 607–618.
2. *Bonnington K. E., Kuehn M. J.* Protein Selection and Export via Outer Membrane Vesicles // *Biochimica et biophysica acta*. 2014. V. 1843 (8). P. 1612–1619.
3. *Beveridge T. J.* Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles // *Journal of Bacteriology*. 1999. V. 18(16). P. 4725–4733.
4. *Knox K. W., Vesik M., Work E.* Relation Between Excreted Lipopolysaccharide Complexes and Surface Structures of a Lysine-Limited Culture of *Escherichia Coli* // *Journal of Bacteriology*. 1966. V. 92 (4). P. 1206–1217.
5. *Leo P., Stork M., Ley P.* Outer Membrane Vesicles as Platform Vaccine Technology // *Biotechnology Journal*. 2015. V. 10 (11). P. 1689–1706.
6. Информационный бюллетень № 12 Всемирной Организации Здравоохранения: сдерживание развития устойчивости к противомикробным препаратам. 2010. № 88. С. 877–953.
7. *Bishop D. G., Work E.* An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysinelimiting conditions // *Biochem. J.* 1965. V. 96. P. 567–576.
8. *Rothfield L, Pearlman-Kothencz M.* Synthesis and assembly of bacterial membrane components. A lipopolysaccharide-phospholipid-protein complex excreted by living bacteria // *J. Mol. Biol.* 1969. V. 44. P. 477–492.
9. *Antranikian G., Herzberg C., Mayer F., Gottschalk G.* Changes in the cell envelope structure of *Clostridium* sp. strain EM1 during massive production of α -amylase and pullulanase // *FEMS Microbiol. Lett.* 1987. V. 41. P. 193–197.
10. *Specka U., Spreinat A., Antranikian G., Mayer F.* Immunocytochemical Identification and Localization of Active and Inactive Amylase and Pullulanase in Cells of *Clostridium thermosulfurogenes* EM1 // *Microbiol.* 1991. V. 57. P. 1062–1069.
11. *Kulp A., Kuehn M. J.* Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles // *Annu Rev Microbiol.* 2010. V. 64. P. 163–184.
12. *Silhavy T. J., Kahne D., Walker S.* The Bacterial Cell Envelope // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010. a000414.
13. *Kadurugamuwa J. L., Beveridge T. J.* Virulence Factors Are Released from *Pseudomonas Aeruginosa* in Association with Membrane Vesicles during Normal Growth and Exposure to Gentamicin: A Novel Mechanism of Enzyme Secretion // *Journal of Bacteriology*. 1995. V. 177 (14). P. 3998–4008.

14. *McBroom A. J., et al.* Outer Membrane Vesicle Production by *Escherichia Coli* Is Independent of Membrane Instability // *Journal of Bacteriology*. 2006. V. 188 (15). P. 5385–5392.
15. *Kadurugamuwa J. L., Beveridge T. J.* Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 2767–2774.
16. *Mashburn-Warren L., et al.* Interaction of Quorum Signals with Outer Membrane Lipids: Insights into Prokaryotic Membrane Vesicle Formation // *Molecular Microbiology*. 2008. V. 69 (2). P. 491–502.
17. *Olofsson A.* Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles / *A. Olofsson, A. Wallstrom, K. Petzold, N. Tegtemeyer, J. Schleucher, S. Carlsson, R. Haas, S. Backert, G. Grobner, A. Arnqvist* // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 77. P. 1539–1555.
18. *Wai S. N.* Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin / *S. N. Wai, B. Lindmark, T. Soderblom, A. Takade, M. Westermarck, J. Oscarsson, J. Jass, A. Richter-Dahlfors, Y. Mizunoe, B. E. Uhlin* // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 115 (1). P. 25–35.
19. *Schwechheimer C., Sullivan J., Kuehn M. J.* Envelope Control of Outer Membrane Vesicle Production in Gram-Negative Bacteria // *Biochemistry*. 2013. V. 52 (18). P. 3031–3040.
20. *Devoe I. W., Gilchrist J. E.* Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis* // *J. Exp Med.* 1973. V. 138. P. 1156–1167.
21. *Gankema H., Wensink J., Guinee P. A., Jansen W.H., Witholt B.* Some characteristics of the outer membrane material released by growing enterotoxigenic *Escherichia coli* // *Infect Immun.* 1980. V. 29. P. 704–713.
22. *Bauman S.J., Kuehn M.J.* Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response // *Microbes Infect.* 2006. V. 8. P. 2400–2408.
23. *McBroom A. J., Kuehn M. J.* Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response // *Biochemistry*. 2013. V. 52 (18). P. 3031–3040.
24. *Katsui N.* Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli* / *N. Katsui, T. Tsuchido, R. Hiramatsu S., Fujikawa, M. Takano I., Shibasaki* // *J. Bacteriol.* 1982. V. 151. P. 1523–1531.
25. *McMahon K. J., et al.* Biogenesis of Outer Membrane Vesicles in *Serratia Marcescens* Is Thermoregulated and Can Be Induced by Activation of the Rcs Phosphorelay System // *Journal of Bacteriology*. 2012. V. 194 (12). P. 3241–3249.

26. Eddy J. L. Production of Outer Membrane Vesicles by the Plague Pathogen *Yersinia pestis* / Eddy J. L., Giolda L. M, Caulfield A. J., Rangel S. M., Lathem W. W. // *PLoS One*. 2014. 9(9): E107002.26.
27. Thompson S. S., Naidu Y. M., Pestka J. J. Ultrastructural localization of an extracellular protease in *Pseudomonas fragi* by using the peroxidaseantiperoxidase reaction // *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. V. 50. P. 1038–1042.
28. Manning A. J., Kuehn M. J. Contribution of bacteriae outer membrane vesicles to innate bacterial defense // *Microbiology*. 2011. V. 11 (258).
29. Kesty N. C., Kuehn M. J. Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 2069–2076.
30. Kadurugamuwa J. L., Beveridge T. J. Delivery of the Non-Membrane-Permeative Antibiotic Gentamicin into Mammalian Cells by Using *Shigella Flexneri* Membrane Vesicles // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998. V. 42 (6). P. 1476–1483.
31. Inagaki S., et al. *Porphyromonas Gingivalis* Vesicles Enhance Attachment, and the Leucine-Rich Repeat BspA Protein Is Required for Invasion of Epithelial Cells by ‘*Tannerella Forsythia*’ // *Infection and Immunity*. 2006. V. 74 (9). P. 5023–5028.

МАЛКОВА Марина Анатольевна – магистрант, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: marina.anatolevna.93@mail.ru

ДУДИНА Любовь Геннадьевна – аспирант, инженер кафедры биотехнологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: necdew@mail.ru

ДЕВРИШОВ Давуд Абдулсемедович – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой иммунологии и биотехнологии, Московская государственная академия ветеринарной медицины

и биотехнологии им. К. И. Скрябина. 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, 23.

E-mail: davud@agrovvet.ru

БЫВАЛОВ Андрей Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры биотехнологии; Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: byvalov@nextmail.ru