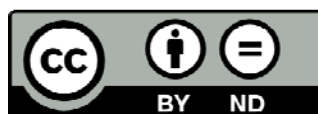




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Descripción de un nuevo tipo de vesícula de membrana externa en bacterias gramnegativas: implicaciones en el contenido de DNA y RNA

Carla Pérez Cruz



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NoDerivatives 3.0. Spain License.



**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN**

**Dra. Elena Mercadé Gil**

**DESCRIPCIÓN DE UN NUEVO TIPO DE  
VESÍCULA DE MEMBRANA EXTERNA EN  
BACTERIAS GRAMNEGATIVAS:  
IMPLICACIONES EN EL CONTENIDO DE DNA Y  
RNA**

**CARLA PÉREZ CRUZ 2018**



**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA**

**DESCRIPCIÓN DE UN NUEVO TIPO DE VESÍCULA DE MEMBRANA  
EXTERNA EN BACTERIAS GRAMNEGATIVAS: IMPLICACIONES EN EL  
CONTENIDO DE DNA Y RNA.**

**Memoria presentada por CARLA PÉREZ CRUZ para optar al título de Doctor  
por la Universidad de Barcelona**

**Dra. Elena Mercadé Gil**

**Carla Pérez Cruz**

**CARLA PÉREZ CRUZ 2018**





*“La verdad es de cada uno  
y una sonrisa pa’ quien la vea”*

*Pegatina*



## AGRADECIMIENTOS

Ningún ser humano es una isla, así pues, llegó el momento de agradecer a todas aquellas personas (o animales) que conscientemente o de forma espontánea han formado parte de esta tesis doctoral. ¡ATENCIÓN! A todos aquellos *Pompeu Fabra* en este apartado están permitidas las faltas de ortografía, el uso de más de una lengua, onomatopeyas, emoticonos, construcciones extrañas y sin dudar, MAYÚSCULAS.

En primer lloc, voldria agrair a la meva directora de Tesis, Elena Mercadé (alias Mile). Moltes gràcies per donar-me l'oportunitat de fer el doctorat amb tu i per tot el seguiment realitzat que m'ha permès desenvolupar-me com a persona. Moltes gràcies per la comprensió, per l'espai que m'has deixat per equivocar-me i aprendre dels meus errors. M'has ensenyat que la curiositat, motivació, fer el que t'agrada i ciència poden anar de la mà i sense cap interès més enllà que el coneixement. Tinc l'esperança d'haver adquirit alguna cosa del teu *savoir-faire*, aquesta elegància innata ajuntada amb una capacitat resolutiva magnífica, que et permet gestionar qualsevol problema, ja sigui a nivell personal o arreglar qualsevol aparejo, com una impressora. Tot això, sense deixar d'anar conjuntada (*cúanto glamour*). Sempre guardaré molt bons records d'aquesta tesis i en especial, dels congressos que hem anat juntes que ens han permet conèixer-nos més enllà del context del laboratori; mai oblidaré els *paseítos* en bici, els restaurants cuquis, la violinista de Leipzig, el xinorri de Valencia y sense cap dubte, les converses i las RISAS. T'admiro com a dona, mare, jefa i científica, així que sempre et tindrè molt present i ets un referent per mi. Per últim, fer constar que aquesta tesis mai hagués estat possible sense tu, així que felicitats!

A ver, M<sup>a</sup> Jesus y Carmen... QUÉ VA A SER DE MI SIN VOSOTRAS! Potser vosaltres dos juntament amb la Mile sou de les persones que més han influït en la meua manera d'entendre les coses en els últims anys i que m'ha permès adornar-me'n de moltes coses. De totes dues, admiro la constància i lo perfeccionistes que sou, pero sin llegar a ser repelentes, ni estar pendent dels demés, ni posar males cares (atrás envidiosos!) Teniu molt clar el que s'ha de fer en cada moment, fer les coses amb temps i amb carinyu. Potser no son coses "guais", però *contra todo pronóstico*, les sabeu fer guais. Potser es la vostra naturalitat, el marujeísmo medular o simplement, perquè sou extremadament generoses i carismàtiques, sempre disposades a donar un cop de mà a qualsevol! Us anyoraré molt.

¡Qué será ahora del mundo sin nuestras sesiones matutinas en la cocina discutiendo temas de IMPORTANCIA MUNDIAL (y comida rica también)! 2018...NUEVA CRISIS.

Parlant d'arreglar el món... al despatxet de la Lucia també l'hem millora't bastant..., no? Moltes gràcies per tots els dinars, les xerrades, facilitar-me la vida amb la burocràcia ( ara la tolero una mica més). M'agrada molt el positivisme que tens a la hora d'afrontar la vida, sempre prenen nous reptes.... i pujar qualsevol muntanya! Simplement, t'admiro.

Aquí agrair a tota la Secció de Microbiologia, de la qual en sóc part desde el 2009 quan vaig entrar sent una pipiòla *undergraduada*. La primera que vaig conèixer va ser l' Ornella, en aquell moment una doctoranda en sus inicis i que sense tu probablement no hagués iniciat aquest projecte! Moltes gràcies pels anys inicials, pels dinars al banquito, els cafetonets i menuda panda hicimos con el Perri del Xavi! Moltes gràcies Xavier Fernández Casi Doctor per els momentazos lokura y tu sabiduria *trash*, estic molt convençuda que ens queden molts coros de la Barceloneta pa' gozar i moltes rajadas sin medida, que son tant sanes pel cutis. També vull agrair a la Mónica per la confiança dipositada i la teva amistat, *namaste*.

També vull agrair a totes les persones que han passat pel departament per fer un doctorat, pràctiques o simplement, *alimentos*. Un record a las ya DOCTORAS Sara, Eleonora, Joana, Lidia i Ari, que sense vosaltres no hagués estat el mateix. I un pensament positiu també pels futurs doctors i doctores Nico, Shirin, Anderson i Montse, molts ànims!! Guille me acuerdo también de ti, pero como siempre.... navegando en aguas Internacionales, però oye.... SEMPRE A FLOTE. Moltes gràcies perquè el departament seria un lloc molt diferent sense tu! PLAZA FIJA YA! També agrair a los sèniors del departamento, Anna Marqués ( no canvies nunca!), Àngels Manresa, Merche Berlanga, Carme Fusté, Núria Rius, David Miñana, Congre i Maribel. També a les pluriempleadas de Núria Bozal, Asun i Ajo. Un record para la roja de Dolors Simon a la qual vaig okupar.

Una part important d'aquesta tesis es va realitzar a la Unitat de Criomicroscòpia dels CCiT-UB. En en aquell moment estava... Carmen al mando! Gracias Carmen López, por tu pasión, y capacidad de lucha. A Gemma i Yolanda, per que va ser un autèntic luxe petar la xerrada amb vosaltres, sou unes persones molt formidables. També tornar agrair la Lidia Delgado que sense la teva *expertise* de crio ;), tu paciència y treball de formigueta, certs experiments no haguessin estat possibles. Moltes gràcies a totes ☺

Bueno ara un espacio pa' los "Alegres" de A.S.R. TAGORE. QUE AÑOS MÁS GUAIS! Ostres que hagués fet jo sense les BRIVES, GUITARREOS, DESKICI, PAREDS VERTICALS QUE S'HAN DE BAIXAR, FURGOS MASSA CARREGADES en resumen... AVENTURAS! Moltes gràcies al Pau Jorba ( siempre confiaré ciegamente en ti), a la Naroa per les birrilles infinites i moments de lokura espontanis, a mi Laura Margalló ( Baloo, tranqui si te mueres juro aquí sobre mi tesis doctoral que cuidaré dels teus xurumbeles, seré la madrina...però res de MONA anual), Carla Vilanova ( Mi mujé, gracias por lavarme los anteojos), Marta Akela (estoy llena de orgullo y satisfacción por ti), Laura Jorba (estamos pa' comprar sandalias y más!) Dani Madrigal (t'has pres la lactasa?), David Saldaña (¿pa' cuando el duo dinámico?), Clara Ribera (qué MORENA más valiente!), a la Laia Vilanova, perquè sense tú no hagués conegut aquest mundillo que te transforma, quanta raó tenies!! Judicita (FeEelicidad en traje de unicornio), Tufli, pechulechu tu! Moltes gràcies a tots aquellxs que han format part de Tagore, ja sigui com Infant o com a kraal: Kone, Roger, Rusti, l'estol de llops i les unitats de Pioners ( tant la malota com la buenota). Brigades verds i negres 4ever!

També donar les gràcies a la Marta i l'Aina per fer-me un espai en les vostres vides durant molts anys i que tot fos tant fàcil. També al Roger, perquè no hay dos como tu ☺. Durant molts de temps va ser pilars de la meua vida i em va fer molt feliç. Els moments de fideus, concerts i de concerts equivocats de dia, feliços no-aniversaris, Navarra, Pineda o Olost no los cambio por nada! Agrair al Gonzi, Jane i Joan per les birrilles i els seus balconets quan erem pipiolos!! A la Nidi, per ser gent pacífica que NO LI AGRADA CRIDAR!!! Realment sou part d'aquesta tesis, així que si voleu... a LEER!

A mis #farmafriends (cuánto postureo por el mundo) Marta, Joan i Edu! Moltes gràcies per la vostra amistat i companyia! La verdad es que m'encanta anar a fer el hipster en barna amb vosaltres, que si filmo, expo, vermut- jazz.... Moltes gràcies Joan i Marta, que hem estat molt coetanis de la tesis i he après molt de les vostres experiències, sou persones intel·ligentíssisissisissisissisimes. Edu, me fascina tu sensibilidad bien, me falta mucho por aprender. Estic molt orgullosa de tots vosaltres, UN CANGREJO YA!

Als amics i companys de Viena! To my flatemates Barbara and Bella, thank you very much for be soooooo easygoing! Also I want to thank to all the people from Udo's lab and Isabella Moll's Lab: Tanino, Nick, Doro, David (Rosi too), Chris, Flavia, Marlena, Petra and Konsta than you all for you for the amazing Applestrudel and sharing your time with me and be so kind to me, it was really fun!! I REALLY MISS YOU ALL. Also I

wanna thanks to Elisabeth for your wise advices! Aquí no me puedo olvidar de Silvia Cervero que estas feta una Masterchief de la Micro, moltes gràcies per acollir-me i gairebé adoptar-me, va ser massa guai tenir l' oportunitat de coneixe't millor, ets extremadament generosa i divertida! També moltes gràcies al Marçal, tots dos em van fer sentir com si portés vivint a Viena milers d'anys. Pa' cuando unes wineries?

Agrair a la meva família oficial, moltes gràcies a la meva mare Isabel per la seva valentia i coratge, que son un exemple de vida. També gràcies per la teva passió per la cultura que segur que va influir a que fòssim persones curioses (en busca de algo que nos sorprenda). Gràcies a la meva germana gran Aida per tots els anys que hem estat juntes. Durant aquest temps mai vaig tenir la sensació d'estar sola perquè sempre hi erets, gràcies per compartir els teus hobbies amb mi! Estic molt contenta i orgullosa de la family de guapos que tens! També a la Lia Liló que continuïs vivint un munt d'aventures i experiències que siguin font d'inspiració de noves performance i anades de olles (*fiuuuuuuuuuuuuuu*)! Realment ha estat xuli que ens haguem pogut conèixer una mica més aquests últims anys! A l'animal de la Tekila, eres un ejemplo vivo de viure el present i d'anar a per totes, eres totalmente kundalínica! Moltes gràcies pels paseítos a lugares recónditos y secretos.

També agrair les meves compis de pis. Gràcies per compatir un trosset de la vostra vida amb mi! Gràcies a la Tamara por reeducarme para vivir en un piso comunal (*que grande Homer!*). Moltes gràcies per les sessions d'infusions i sofà que mai sabíem quan ens aniríem a dormir. *Waheguru* Tamara. A la Cris Amadooooooooo, por sudarte el coño medio mundo! A la Bea, eres una pedazo de artista y persona, he aprendido mucho de ti y me encanta la capacidad que tienes de reinventarte! Alba, muchas gracias por tu idealismo puesto en la tierra que hace que seas una fuente de inspiración para todos los que te rodean y también por ser una profesorita que hace que no sea necesario consultar wikipedia (*cúanto aprendo yo con esta mujé*). Realmente muchas gracias por tu amistad y paciencia durante la escritura de esta tesis (*lo que ha aguantao!*).

Per últim agrair a la Facultat de Farmàcia, especialment, a tota la gent que hi treballa, sobretot perquè heu fet aquesta sigui la meva meva segona casa. També, al meu sponsor: APIF-UB.

Ya hemos *llegao* al final, por tanto si tu nombre no esta... me disculpo y para compensar, te invito a ALGO!!

ESTA SECCIÓN CONTINUARÁ EN BARES DEL MUNDO... ☺







## RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se presenta la descripción y caracterización de un nuevo tipo de vesícula de membrana externa (MV) en bacterias gramnegativas, hallada tanto en cepas ambientales como en cepas patógenas. Para la caracterización de estas nuevas MVs se han utilizado técnicas de Criomicroscopía (Cryo-EM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de cortes ultrafinos de muestras preparadas mediante criofijación y criosustitución (HPF-FS). La descripción del nuevo tipo de MVs ha aportado un nuevo modelo de vesiculación que sucede a través de la protuberancia conjunta de la membrana externa e interna, incorporando contenido del citoplasma. Éstas nuevas vesículas han sido nombradas como Vesículas de Membrana Externa e Interna (*Outer-inner membrane vesicle*, O-IMV). El inmunomarcaje de cortes ultrafinos de vesículas con un anticuerpo específico contra DNA, ha permitido confirmar que el DNA detectado en muestras de MVs, es exportado en el interior de las nuevas O-IMVs.

Las técnicas de TEM de cortes ultrafinos después de HPF-FS y Cryo-EM han sido esenciales para caracterizar el nuevo tipo de MVs. Asimismo, también han sido útiles para la caracterización de una cepa mutante hipervesiculante por delección de un componente estructural de la envuelta bacteriana, demostrando que los incrementos de MVs detectados como proteína o LPS, son causados por la presencia de artefactos vesiculares cuya funcionalidad se encuentra alterada respecto a las vesículas de la cepa salvaje.

La descripción de las O-IMV ha permitido explicar cómo contenido del citoplasma es incorporado en vesículas. Este descubrimiento ha abierto la puerta a estudiar el RNA asociado a MVs de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Se ha demostrado que el RNA en vesículas presenta unos tamaños comprendidos entre 40 –80 nucleótidos y contienen una proporción mucho menor de RNA ribosomal en comparación con la célula. La transcriptómica realizada comparando el contenido de RNA de muestras de MVs y células, ha confirmado que las MVs presentan un patrón de expresión de RNA distinto al celular, empaquetando mayoritariamente tRNAs. Además, se ha demostrado que el RNA internalizado en MVs es estable. Por otra parte, el estudio de la vesiculación asociada al crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, ha determinado que la vesiculación no es constante y va estrechamente ligada a la fisiología de la bacteria, detectando una mayor secreción de MVs con RNA al final de la fase exponencial, para posteriormente desaparecer. Todos estos resultados, indicarían que la presencia de RNA en MVs no es

aleatoria sino debida a un mecanismo molecular de encapsulación. Se requerirán más estudios para poder determinar qué función biológica puede realizar el RNA secretado en MVs de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

## ABREVIATURAS

<b>1D SDS-PAGE</b>	Gel poliacrilamida de 1 dimensión
<b>AHLs</b>	N-acilhomoserina lactona
<b>C</b>	Citoplasma
<b>CC</b>	Contenido citoplasmático
<b>CCR</b>	Represión del catabolismo del carbono
<b>CF</b>	Criofijación
<b>Cryo-TEM</b>	Criomicroscopía
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EPS</b>	<i>Extracellular polymeric substance</i>
<b>EV</b>	Vesículas extracelulares
<b>FC</b>	Fibrosis quística
<b>HPF-FS</b>	<i>High-Pressure Freezing , Freeze Substitution</i>
<b>IM</b>	Membrana interna
<b>LN<sub>2</sub></b>	Nitrógeno líquido
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido bacteriano
<b>mirRNA</b>	microRNA
<b>MV</b>	Vesícula de membrana
<b>ncRNA</b>	<i>non-coding</i> RNA
<b>nt</b>	Nucleótidos
<b>o/n</b>	Overnight
<b>OM</b>	Membrana externa
<b>OMVs</b>	Vesícula membrana externa
<b>Os4O4</b>	Tetraóxido de osmio
<b>P</b>	Periplasma
<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógeno
<b>PF</b>	<i>Plunge freezing</i>
<b>PQS</b>	<i>Pseudomonas Quinolone Signal</i>
<b>QS</b>	Quorum sensing
<b>RBP</b>	<i>RNA-binding proteins</i> , RBP
<b>RBS</b>	<i>Ribosome binding site</i>
<b>RIN</b>	RNA integrity number
<b>RT</b>	Temperatura ambiente
<b>RT-qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>sf-GFP</b>	<i>Superfolded- GFP</i>
<b>sRNAs</b>	<i>small RNA</i> ,
<b>TEM</b>	<i>Microscopia electrónica de transmisión</i>
<b>TFs</b>	<i>Factores de transcripción</i>
<b>tRFs</b>	<i>tRNA-derived fragments</i>



## ÍNDICE



<b>ÍNDICE</b>	
<b>RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>v</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. VESICULAS DE MEMBRANA EXTRACELULARES</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA BACTERIANA (OMVs)</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 FUNCIONES DE LAS OMVs</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 Adquisición de nutrientes y eliminación de bacterias competidoras.....	4
1.2.2 OMVs en la virulencia de cepas gramnegativas patógenas.....	5
1.2.2.1 Secreción de toxinas y factores de virulencia.....	5
1.2.2.2 Modulación de la respuesta inmune del huésped.....	6
1.2.3 OMVs como mecanismo de defensa.....	6
1.2.4 OMVs en la formación de biofilms.....	7
1.2.5 OMVs en la transferencia de material genético.....	8
<b>1.3 BIOGÉNESIS DE LAS OMVs</b> .....	<b>9</b>
1.3.1 Modulación de las uniones proteicas presentes en la envuelta bacteriana.....	11
1.3.2 Lipopolisacárido bacteriano (LPS).....	12
1.3.3. Modificación en la composición de lípidos.....	13
1.3.4. Aumento de la turgencia en el espacio periplásmico.....	14
<b>1.4 COMPOSICIÓN DE LAS OMVs</b> .....	<b>16</b>
1.4.1 Presencia del contenido del citoplasma en OMVs.....	19
1.4.2 Modelos de incorporación del DNA en OMVs.....	20
<b>1.5 VISUALIZACIÓN DE OMVs MEDIANTE TEM</b> .....	<b>22</b>
1.5.1 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) de cortes ultrafinos.....	23
1.5.1.1 TEM de cortes ultrafinos obtenidos mediante métodos convencionales.....	24
1.5.1.2 TEM de muestras preparadas por criofijación y criosustitución.....	26
1.5.1 Criomicroscopia Electrónica (Cryo-EM).....	29
<b>2. SECRECIÓN DE small RNA MEDIANTE OMVs</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1 SECRECIÓN DE ncRNA EN VESÍCULAS PRODUCIDAS POR CÉLULAS DE MAMÍFEROS</b> .....	<b>33</b>
2.1.1 Los RNA no codificantes de células eucariotas: miRNAs.....	35
2.1.2 Transferencia de miRNAs mediante EVs.....	36
<b>2.2 RNAs NO CODIFICANTES EN BACTERIAS</b> .....	<b>38</b>
2.2.1 Tipos de sRNA en bacterias.....	39
2.2.2 Ventajas de la regulación mediada por sRNA.....	41
<b>2.3 LA BACTERIA DE ESTUDIO: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	<b>42</b>
2.3.1 El “ciclo de vida” de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	42



2.3.2 Patogenicidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> asociada al ciclo de vida .....	44
2.3.3 Quorum sensing en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	46
2.3.4 sRNA y la formación de biofilms en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	48
2.3.4.1 sRNAs involucrados en la transición a biofilm: RsmX/Y/Z.....	49
2.3.4.2 sRNA involucrado en la síntesis de PQS en condiciones de hipoxia: PhrS.....	51
2.3.4.3 sRNA involucrado en el control metabolismo carbono: CrcZ.....	52
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
<b>1. MICROORGANISMOS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....</b>	<b>63</b>
<b>1.1 MICROORGANISMOS.....</b>	<b>63</b>
<b>1.2 MEDIOS DE CULTIVO.....</b>	<b>63</b>
1.2.1 Suplementos de medios de cultivo.....	65
<b>1.3 CONDICIONES DE CULTIVO.....</b>	<b>65</b>
1.3.1 Cultivos sólidos.....	65
1.3.2 Cultivos líquidos.....	65
<b>2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE OMVs.....</b>	<b>67</b>
<b>2.1 AISLAMIENTO DE OMVs.....</b>	<b>67</b>
<b>2.2 PURIFICACIÓN DE LAS OMVs.....</b>	<b>67</b>
<b>3. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE OMVs.....</b>	<b>68</b>
<b>3.1 PROTEÍNA POR BRADFORD.....</b>	<b>68</b>
<b>3.2 LPS POR PURPALD.....</b>	<b>68</b>
<b>3.3 CUANTIFICACIÓN OMVs POR SU CONTENIDO EN LÍPIDOS.....</b>	<b>68</b>
<b>3.4 CITOMETRÍA DE ALTA RESOLUCIÓN.....</b>	<b>69</b>
<b>4. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.....</b>	<b>69</b>
<b>4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).....</b>	<b>69</b>
4.1.1 Tinción negativa.....	69
4.1.2 Criofijación por alta presión y Criosustitución ( <i>High Pressure Freezing and Freeze- Substitution</i> , HPF-FS).....	70
4.1.3 Cortes ultrafinos.....	70
4.1.4 Inmunomarcaje de DNA de cortes ultrafinos de OMVs.....	71
<b>4.2 CRYO-EM.....</b>	<b>72</b>
4.2.1 Visualización de muestras de OMVs preparadas por <i>Plunge-Freezing</i> (PF).....	72
4.2.2 Observación mediante Cryo-EM de suspensiones bacterianas preparadas por <i>Plunge-Freezing</i> (PF).....	72
<b>5. PROTEÓMICA.....</b>	<b>73</b>
<b>5.1 GEL DE PROTEÍNAS 1D SDS-PAGE.....</b>	<b>73</b>
<b>5.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.....</b>	<b>74</b>
<b>6. DETECCIÓN MEDIANTE WESTERN BLOT DE LA PROTEÍNA Hfq.....</b>	<b>74</b>
<b>6.1 SOLUCIONES UTILIZADAS.....</b>	<b>75</b>

<b>7. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE DNA ASOCIADO A OMVs MEDIANTE EL ENSAYO Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit .....</b>	<b>76</b>
<b>8. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE ATP ASOCIADO A OMVs.....</b>	<b>76</b>
<b>9. ESTABLECIMIENTO DE UNA ZONA DE TRABAJO <i>RNase-FREE</i>.....</b>	<b>77</b>
<b>10. AISLAMIENTO DEL RNA PRESENTE EN OMVs Y CÉLULAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 .....</b>	<b>79</b>
<b>11. CUANTIFICACIÓN FLUORIMÉTRICA DEL RNA TOTAL MEDIANTE <i>Qubit RNA HS Assay Kit</i>™ .....</b>	<b>79</b>
<b>12. DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES ELECTROFORÉTICOS DEL RNA POR BIOANALYZER .....</b>	<b>79</b>
<b>13. CUANTIFICACIÓN DE sRNAs MEDIANTE RT-PCR.....</b>	<b>80</b>
<b>13.1. TRATAMIENTO CON DNAsa DEL RNA EXTRAIDO .....</b>	<b>80</b>
<b>13.2. CONVERSIÓN DEL RNA A cDNA (RETROTRANSCRIPCIÓN). .....</b>	<b>81</b>
<b>13.3 CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE LA EXPRESIÓN DE LOS sRNAs .....</b>	<b>81</b>
13.3.1 Cebadores.....	81
13.3.2 Optimización de la qPCR y condiciones establecidas.....	81
<b>14. ENSAYO DE PROTECCIÓN DEL RNA VESICULAR FRENTE UN TRATAMIENTO CON RNAsas (<i>RNase protection assay</i>) .....</b>	<b>83</b>
<b>15. SECUENCIACIÓN MASSIVA DE sRNA PROCEDENTE DE OMVs Y CÉLULAS DE <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (RNA-SEQ).....</b>	<b>84</b>
<b>15.1 PREPARACIÓN DE LAS LIBRERÍAS .....</b>	<b>84</b>
<b>15.2 BIOINFORMÁTICA DEL PROCESO DE RNA-SEQ .....</b>	<b>85</b>
<b>16. ESTABILIDAD DEL RNA ENCAPSULADO EN EL INTERIOR DE LAS OMVs 85</b>	
<b>17. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE VESICULACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE ALTA RESOLUCIÓN EN SOBRENADANTES DE <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....</b>	<b>86</b>
<b>18. EXTRACCIÓN DE LA PIOCIANINA DE LOS SOBRENADANTES DE <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....</b>	<b>87</b>
<b>19. RECUENTO BACTERIANO POR EL METODO DE DILUCIÓN Y SIEMBRA EN SUPERFICIE.....</b>	<b>87</b>
<b>20. TRANSFERENCIA DE sRNAs MEDIANTE OMVs.....</b>	<b>87</b>
<b>20.1 PLÁSMIDOS Y PRIMERS UTILIZADOS.....</b>	<b>87</b>
<b>20.2 TÉCNICAS MOLECULARES .....</b>	<b>88</b>
20.2.1 Obtención de DNA genómico y plasmídico.....	88
20.2.2 Amplificación del DNA para su clonaje.....	89
20.2.3 Purificación del DNA.....	89
20.2.4 Digestión enzimática del DNA.....	89
20.2.5 Ligación de fragmentos de DNA.....	89
20.2.6 Transformación y selección de clones.....	89
20.2.7 Preparación de células electrocompetentes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y Electroporación .....	90

<b>20.3. CONSTRUCCIÓN DE LAS FUSIONES TRADUCCIONALES .....</b>	<b>91</b>
20.3.1 Construcción de la fusiones traduccionales <i>amiE::sf-GFP</i> .....	91
20.3.2 Contrucción de la fusión traduccional <i>hcnA::sf-GFP</i> .....	91
<b>20.4 CLONAJE DE CrcZ BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR pBAD .....</b>	<b>92</b>
<b>20.5 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE LAS FUSIONES .....</b>	<b>92</b>
<b>20.6 ESTUDIO DE LA INTERNALIZACIÓN DE CrcZ EN OMVs TRAS LA SOBREENPRESIÓN DE CrcZ EN LAS CÉLULAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>...</b>	<b>93</b>
<b>20.7 ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA DE CrcZ EN OMVs .....</b>	<b>94</b>
20.7.1 Determinación de la transferencia con CrcZ en tubos.....	94
20.7.2 Determinación de la transferencia de OMVs en microplacas. ....	94
20.7.3 Valoración mediante citometría de flujo de la transferencia de CrcZ mediada ...	96
20.7.4 Determinación de la transferencia con CrcZ a partir de sobrenadantes. ....	96
<b>20.8 ENSAYO DE LA CAPTACIÓN DE OMVs POR LA CEPA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <math>\Delta RsmY\Delta RsmZ</math>.....</b>	<b>97</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>99</b>
<b>1. CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO TIPO DE VESÍCULAS EN <i>Shewanella vesiculosa</i> M7<sup>T</sup> .....</b>	<b>101</b>
<b>1.1 ESTUDIO ESTRUCTURAL DE <i>S. vesiculosa</i> M7<sup>T</sup> MEDIANTE TEM DE CORTES ULTRAFINOS OBTENIDOS DESPUÉS DE HPF-FS .....</b>	<b>101</b>
<b>1.2 DETERMINACIÓN DE LA PROPORCIÓN DE LAS NUEVAS VESÍCULAS RESPECTO A LAS CONVENCIONALES.....</b>	<b>103</b>
<b>1.3 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE DNA PRESENTE EN EL INTERIOR DE LAS OMVs .....</b>	<b>105</b>
1.3.1 Cuantificación del DNA asociado a vesículas. ....	105
1.3.2 Inmunomarcaje de DNA de cortes ultrafinos de vesículas aisladas de <i>S.</i> ....	105
<b>1.4. PROTEÓMICA DE VESÍCULAS DE MEMBRANA DE <i>S. vesiculosa</i> M7<sup>T</sup>. ....</b>	<b>108</b>
<b>2. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL NUEVO TIPO DE VESÍCULAS EN BACTERIAS GRAMNEGATIVAS PATÓGENAS.....</b>	<b>111</b>
<b>2.1 ESTUDIO ESTRUCTURAL DE TRES CEPAS PATÓGENAS MEDIANTE TEM DE CORTES ULTRAFINOS OBTENIDOS DESPUÉS DE HPF-FS.....</b>	<b>111</b>
<b>2.2 ESTUDIO ESTRUCTURAL DE MVs AISLADAS DE TRES CEPAS PATÓGENAS MEDIANTE TEM DESPUÉS DE HPF-FS.....</b>	<b>116</b>
<b>2.3 ANÁLISIS MEDIANTE CRYO-EM DE SUSPENSIONES BACTERIANAS DE TRES CEPAS PATÓGENAS. ....</b>	<b>117</b>
<b>2.4 ESTUDIO ESTRUCTURAL DE MVs AISLADAS MEDIANTE CRYO-EM Y DETERMINACIÓN DE LA PROPORCIÓN DE O-IMVs.....</b>	<b>121</b>
<b>2.5 CONTENIDO DE DNA ASOCIADO A LAS MVs DE TRES CEPAS BACTERIANAS PATÓGENAS.....</b>	<b>123</b>
<b>2.5 ESTUDIO PROTEÓMICO DE MVs PURIFICADAS DE <i>N. gonorrhoeae</i> .....</b>	<b>126</b>
<b>2.6 DETECCIÓN DE ATP EN MUESTRAS DE MVs DE CEPAS PATÓGENAS. 127</b>	<b>127</b>
<b>2.8 SEPARACIÓN DE LAS O-IMVs DE LAS OMVs .....</b>	<b>128</b>

2.9 INDUCCIÓN DE LA FORMACIÓN DE O-IMVs CON ANTIBIÓTICOS.....	131
<b>3. ESTUDIO MICROSCÓPICO DE LAS MVs OBTENIDAS DEL MUTANTE HIPERVESICULANTE DE <i>Escherichia coli</i> Nissle <math>\Delta tolR</math></b> .....	<b>135</b>
3.1 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE EcN Y LA CEPA MUTANTE $\Delta tolR$ . ....	136
3.2 VALORACIÓN DEL INCREMENTO EN LA VESICULACIÓN ENTRE LA CEPA EcN Y EcN $\Delta tolR$ POR CUANTIFICACIÓN DE MVs .....	137
3.3 ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LAS CEPAS EcN y EcN $\Delta tolR$ .....	139
3.3.1 Estudio estructural de EcN y EcN $\Delta tolR$ cultivadas en medio solido mediante TEM después de HPF-FS. ....	139
3.3.2 Cryo-EM de MVs de EcN y EcN $\Delta tolR$ .....	141
3.4 MEDIDA DE LA INTERNALIZACIÓN <i>in vitro</i> DE MVs DE EcN Y $\Delta tolR$ POR CULTIVOS EPITELIALES DE Caco-2.....	143
<b>4. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE RNA EN VESÍCULAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1</b> .....	<b>145</b>
4.1 ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE RNA ENCAPSULADO EN MVs EN COMPARACIÓN CON EL CELULAR EN <i>P. aeruginosa</i> PAO1. ....	145
4.2 CUANTIFICACIÓN DE sRNA EN MUESTRAS DE MVs.....	147
4.2.1 Evaluación de la extracción de RNA vesicular mediante el Kit comercial miRNAeasy de Qiagen.....	147
4.2.2 Cuantificación absoluta mediante RT-qPCR de small RNAs en MVs. ....	149
4.2.2.1. Primer paso: optimización de la cuantificación absoluta mediante RT-qPCR. ....	150
4.2.2.2. Segundo paso: cuantificación de sRNAs de diluciones de MVs.....	151
4.2.2.3 Tercer paso: verificación de la optimización de la cuantificación de sRNA en MVs mediante RT-qPCR. ....	152
4.3 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE RNA EN EL INTERIOR DE LAS MVs DE <i>P. aeruginosa</i> PAO1 MEDIANTE UN ENSAYO DE RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON RNAsa .....	154
4.4 ESTUDIO COMPARATIVO MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DEL RNA AISLADO DE MVs Y CÉLULAS DE <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	157
4.4.1. Validación de la RNA-seq.....	164
4.5. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE sRNAs EN MVs EN DISTINTAS ETAPAS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO. ....	164
4.5.1 Caracterización de la vesiculación en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 a lo largo del crecimiento bacteriano. ....	165
4.5.1.1 Optimización de los parámetros para la cuantificación de MVs mediante citometría de alta resolución. ....	165
4.5.1.2 Caracterización de la vesiculación directamente de los sobrenadantes de cultivo de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	167
4.5.1.3 Confirmación de los resultados obtenidos mediante citometría.....	171
4.5.2. Análisis mediante RT-qPCR del contenido de sRNAs en MVs obtenidas a distintos tiempos de la curva de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1. ....	173

4.5.3 RNA-seq de MVs de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 obtenidas a distintos tiempos mediante RT-qPCR.....	176
<b>4.6. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS sRNAs EN MVs de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 DURANTE UNA INCUBACIÓN A 37°C.....</b>	<b>181</b>
<b>4.7. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A RNA Hfq EN MUESTRAS DE MVs de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....</b>	<b>182</b>
<b>4.8. TRANSFERENCIA DE RNAs MEDIADA POR MVs.....</b>	<b>183</b>
4.8.1 Evaluación de la transferencia de CrcZ por MVs. ....	184
4.8.1.1 Generación y validación del constructo <i>amiE::sf-GFP</i> . ....	184
4.8.1.2 Obtención de MVs después de la inducción con arabinosa de la cepa <i>P. aeruginosa</i> PAO1 salvaje con el plásmido pCC3. ....	186
4.8.1.3 Determinación de la transferencia con CrcZ en tubos.....	190
4.8.1.4 Determinación transferencia de CrcZ por MVs en placas de micropocillos. ....	191
4.8.1.5 Determinación de la transferencia con CrcZ a partir de sobrenadantes. ....	194
4.8.2 Evaluación de la transferencia de RsmZ y RsmY por MVs.....	198
4.8.2.1 Construcción y validación de la fusión traduccional <i>henA::sf-GFP</i> . ....	199
4.8.2.2 Análisis de la transferencia de RsmYZ mediada por MVs. ....	200
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>203</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>229</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>233</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>257</b>
<b>IX. PUBLICACIONES .....</b>	<b>277</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**



## I. INTRODUCCIÓN

### 1. VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTRACELULARES

La producción de vesículas extracelulares (EVs) es una característica común en todos los organismos que conforman las tres grandes ramas del árbol de la vida. Es decir, está presente tanto en el dominio *Bacteria* (gramnegativas, grampositivas) como en *Archaea* y por último en el dominio *Eucarya*, tanto en organismos unicelulares como pluricelulares (Deatherage & Cookson, 2012).

Independientemente de su origen, todas las EVs presentan una serie de características comunes. En primer lugar, las EVs forman parte de un sistema de secreción y transporte de moléculas bioactivas, promoviendo la interacción de la célula secretora con el medio extracelular o interaccionando con otras células, sin la necesidad de establecer un contacto directo. Además, presentan una estructura similar ya que se trata de unas estructuras esféricas formadas generalmente por una bicapa lipídica, que incluye en su interior diferentes componentes, como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, o moléculas señalizadoras, que les confieren una gran diversidad funcional. También permiten la liberación del contenido envuelto por una bicapa lipídica, por lo que el material secretado se encuentra protegido de enzimas degradativos que pudieran estar presentes en el medio y al mismo tiempo, contienen moléculas de adhesión en su superficie, que favorecen su adquisición o captura por la célula receptora (Kulp & Kuehn, 2010; Théry et al., 2009).

Todas estas características juntas hacen que las EVs hayan surgido recientemente como una pieza clave en la comunicación intercelular, interviniendo en diferentes procesos fisiológicos: median la interacción huésped-patógeno, actúan modulando el sistema inmune, participan en el desarrollo y diferenciación de tejidos en eucariotas, en la formación de biofilms en procariotas, o permiten la secreción de material genético (Yáñez-Mó et al., 2015). Asimismo, el estudio de EVs es un campo de la ciencia que está en plena expansión debido a su potencial biotecnológico tanto en el desarrollo de vacunas o de kits de diagnóstico, tratamiento de enfermedades, o como vehículo de transporte de moléculas terapéuticas (Théry et al., 2009; Yoon et al., 2014).

Ahora bien, existen diferentes tipos de EVs en función de su origen, formación o tamaño. En eucariotas podemos diferenciar 2 subtipos principales: los **exosomas**, que presentan unos diámetros inferiores a 100-150 nm y que se originan en el interior de la célula, concretamente en cuerpos multivesiculares; mientras que las vesículas que se originan a



partir de la membrana plasmática y que presentan una gran disparidad de diámetros (100-1000 nm) se denominan **ectosomas, microvesículas, micropartículas, oncosomas o cuerpos apoptóticos** (Mateescu et al., 2017). Por el contrario, en procariotas se originan un solo tipo de vesícula a partir de la envuelta bacteriana más externa. En función de si se trata de una bacteria grampositiva se denominan **vesículas de membrana**, mientras que en bacterias gramnegativas se designan **vesícula de membrana externa** (Deatherage & Cookson, 2012).

### 1.1 VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA BACTERIANA (OMVs)

Las vesículas de membrana externa (*outer membrane vesicles*, OMVs) son estructuras esféricas, con un diámetro comprendido entre 20-300 nm, originadas a partir de la expansión de la membrana externa bacteriana (*outer membrane*, OM), que comporta la encapsulación de contenido del periplasma (P) en su interior. Por lo tanto, las OMVs están formadas por una bicapa lipídica procedente de la OM, compuesta por lipopolisacáridos (LPS), fosfolípidos y proteínas de membrana externa y en el interior, generalmente se encuentran proteínas solubles procedentes del periplasma. Curiosamente, también se ha descrito en las OMVs la presencia de RNA, DNA y otros compuestos del citoplasma, junto con componentes de la membrana interna bacteriana (*inner membrane*, IM).

### 1.2 FUNCIONES DE LAS OMVs

En general, las OMVs en bacterias gramnegativas, se consideran parte un sistema de secreción y liberación a través del cual se pueden diseminar productos bacterianos a cierta distancia y transmitir funciones biológicas al medio ambiente y/o sobre otras células. Aunque las funciones que realizan las OMVs aún no se han resuelto completamente, está ampliamente aceptado que los componentes asociados a estas estructuras presentan distintas actividades biológicas, lo cual hace pensar que las OMVs podrían ejercer múltiples roles. A continuación, detallaremos las funciones que se han propuesto para las OMVs (Bonnington & Kuehn, 2014; Kulkarni & Jagannadham, 2014; Kulp & Kuehn, 2010).

#### 1.2.1 Adquisición de nutrientes y eliminación de bacterias competidoras.

Las OMVs contienen enzimas, receptores y transportadores que pueden contribuir a la adquisición de nutrientes y por tanto a la supervivencia de la bacteria (Biller et al., 2014; Nevot et al., 2006a, Lee EY et al., 2008). De este modo, enzimas como una aminopeptidasa de *Pseudomonas aeruginosa* al excretarse asociada a OMVs puede ser

externalizada y al mismo tiempo ser activa, favoreciendo la disponibilidad de una mayor concentración de aminoácidos alrededor de la bacteria (Kulp & Kuehn, 2010). Otro ejemplo similar sería la posible captación y concentración de metales alrededor de la bacteria mediante OMVs, permitiendo que éstos estén disponibles para su absorción y posterior uso, favoreciendo el crecimiento bacteriano (Lin et al., 2017).

El incremento de la actividad degradativa para aumentar la biodisponibilidad de nutrientes, puede beneficiar no sólo a la bacteria secretora, sino también a su huésped o a las células de su entorno. Por ejemplo, los miembros del género *Bacteroides* son actores clave en la simbiosis entre el huésped humano y la microbiota intestinal. Los miembros de este género son conocidos por su capacidad para degradar una amplia variedad de azúcares que luego son absorbidos y empleados por el huésped. Paralelamente, estos azúcares degradados pueden ser empleados por *Bacteroides* y/o otros miembros de la microbiota, dando como resultado la producción de ácidos grasos de cadena corta que también son beneficiosos para el huésped. Se ha observado que miembros de este género como *B. fragilis* y *B. thetaiotaomicron*, producen OMVs que presentan una elevada cantidad de glicosilasas y proteasas, las cuales son activas en ensayos *in vitro* (Elhenawy et al., 2014). Siguiendo esta línea, se ha observado una elevada cantidad de vesículas en los océanos y se supone que las OMVs podrían ser utilizadas como fuente de alimentación en los ecosistemas marinos debido a que formaría parte de la materia orgánica disuelta (DOC) facilitando el crecimiento de los organismos heterótrofos (Biller et al., 2014).

Al mismo tiempo, las OMVs promueven la lisis de otras bacterias ya que contienen en su interior potentes enzimas líticas, concretamente peptidoglicano hidrolasas, que tienen la capacidad de degradar la capa de peptidoglicano tanto de bacterias gramnegativas como grampositivas, provocando la eliminación de microorganismos competidores del entorno y al mismo tiempo, favorecer la asimilación de los nutrientes liberados durante la lisis bacteriana (Kadurugamuwa & Beveridge, 1996; Li et al., 1998).

### **1.2.2 OMVs en la virulencia de cepas gramnegativas patógenas.**

#### *1.2.2.1 Secreción de toxinas y factores de virulencia.*

Se ha demostrado claramente que la virulencia de numerosas bacterias patógenas gramnegativas como *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, depende en parte de la habilidad de secretar diversos factores de virulencia

mediante OMVs. Se ha descrito la presencia de hemolisinas, aerolisinas, fosfolipasas, proelastasas (Unal et al., 2011) y toxinas tales como ClyA o la toxina shiga en *E. coli* (Kolling & Matthews, 1999; Wai et al., 2003), y la toxina Cif en *P. aeruginosa* (Bomberger et al., 2009). Estos factores, al ser transportados en el lumen de las OMVs, quedan protegidos frente a la acción de enzimas o compuestos constitutivos del huésped que podrían inactivarlos, por lo que las OMVs proporcionan una vía alternativa para la liberación de dichos factores (Ellis & Kuehn, 2010; Jan, 2017; Kuehn & Kesty, 2005).

#### *1.2.2.2 Modulación de la respuesta inmune del huésped.*

Por otra parte, las OMVs al desprenderse de la OM bacteriana, inducen la activación del sistema inmune del huésped mediante los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) tales como LPS, lipoproteínas, porinas o PG. De hecho, la respuesta inmune ejercida por las OMVs es mucho mayor que la producida solo por el LPS aislado o por vesículas lisadas (Jun et al., 2013; Jung et al., 2016; Nakao et al., 2011). Por ello, una de las aplicaciones biotecnológicas de las OMVs más interesantes, es la de ser empleadas como vacunas o adyuvantes (Ellis & Kuehn, 2010; Kaparakis-Liaskos & Ferrero, 2015).

Además de sus efectos proinflamatorios, las OMV pueden modular o incluso suprimir la respuesta de las células inmunes del huésped mediante una acción directa (Kaparakis-Liaskos & Ferrero, 2015). Pondríamos como ejemplo el caso de *Legionella pneumophila*, una bacteria intracelular, en la que la internalización de OMVs por la célula huésped induce la replicación de la bacteria mediante la inducción de un miRNA que inhibiría la apoptosis de los macrófagos infectados (Jung et al., 2016). En este mismo sentido, también destacaríamos el trabajo de Koeppen y colaboradores (2016) en el que se describió en *P. aeruginosa* PA14 la secreción de un *small RNA* internalizado en vesículas, que reduciría directamente la secreción de citocinas inducida por la internalización de las OMVs por células del huésped, consiguiendo atenuar la respuesta proinflamatoria.

#### **1.2.3 OMVs como mecanismo de defensa.**

Debido a que las OMVs mimetizan la OM bacteriana, se ha propuesto que éstas también podrían actuar como primer mecanismo de defensa contra aquellas sustancias que atacan directamente la membrana externa bacteriana. Algunos estudios han observado que cuando una población bacteriana se pone en contacto con un antibiótico o con un fago, producen una gran cantidad de OMVs con dos posibles finalidades. La primera sería

evitar que el agente tóxico entre en el interior de la bacteria mediante la eliminación y renovación de la OM y la segunda sería bloquear la acción del agente tóxico mediante su unión a OMVs. Estos factores pueden ser tanto abióticos (antibióticos, detergentes, etc.) como bióticos (bacteriófagos y anticuerpos) y serían neutralizados mediante OMVs (MacDonald & Kuehn, 2012).

Por otra parte, algunas investigaciones indican que las OMVs actuarían como un mecanismo de secreción de compuestos tóxicos o de productos de desecho de celulares, contribuyendo a la supervivencia de la célula. Se ha observado un incremento en la vesiculación originada por una acumulación de proteínas con una conformación incorrecta (Mcbroom & Kuehn, 2007). También se ha descrito que aquellos agentes que activan la respuesta SOS originada por un daño del DNA celular, incrementan los niveles de vesiculación, aunque el mecanismo por el cual se produce continúa siendo desconocido (MacDonald & Kuehn, 2013).

#### **1.2.4 OMVs en la formación de biofilms.**

Se considera que la mayoría de las bacterias en la naturaleza viven formando biopelículas también denominadas biofilms, los cuales se definen como comunidades de células adheridas a una superficie biológica o inerte y rodeadas por una matriz extracelular polimérica (*extracellular polymeric substance*, EPS). Esta matriz contiene entre otros compuestos, DNA, fragmentos de células como flagelos y pilis, proteínas y sirve como “capa” protectora para las bacterias (Hall-Stoodley et al., 2004).

Scouling y Beveridge (2006) mediante la observación por microscopía electrónica de transmisión de biofilms obtenidos *in vitro* o extraídos de entornos naturales de *P. aeruginosa*, describieron por primera vez la presencia de OMVs en las matrices extracelulares, sugiriendo que estas podrían estar implicadas en la señalización dentro del biofilm. Asimismo, el estudio realizado por Yonezawa y colaboradores (2011), demostró que la adición de OMVs a cultivos de *Helicobacter pylori* estimulaba la producción de biofilms, respaldando la idea de que las OMVs estarían implicadas en procesos de formación de comunidades multicelulares (MacDonald & Kuehn, 2012).

Es importante tener en cuenta que los biofilms son estructuras complejas en las que la bacteria deja de vivir en forma libre para desarrollar un comportamiento multicelular. La transición entre el estado libre al de biofilm está guiada por un conjunto de señales difusibles que conforman el sistema de señalización de *Quorum Sensing* (QS). Se ha

propuesto que las vesículas mediarían la transmisión de señales con el fin de facilitar la comunicación bacteriana. Especialmente, se ha propuesto que las vesículas empaquetarían aquellas señales hidrofóbicas que no pudieran difundir en el medio, como es el caso de la señal *Pseudomonas Quinolone Signal* (PQS) secretada por *P. aeruginosa* (Mashburn & Whiteley, 2005; Tashiro et al., 2010) o la señal *N-acilhomoserina lactona* (AHLs) empaquetada en vesículas por *Paracoccus denitrificans* Pd1222 (Toyofuku et al., 2017).

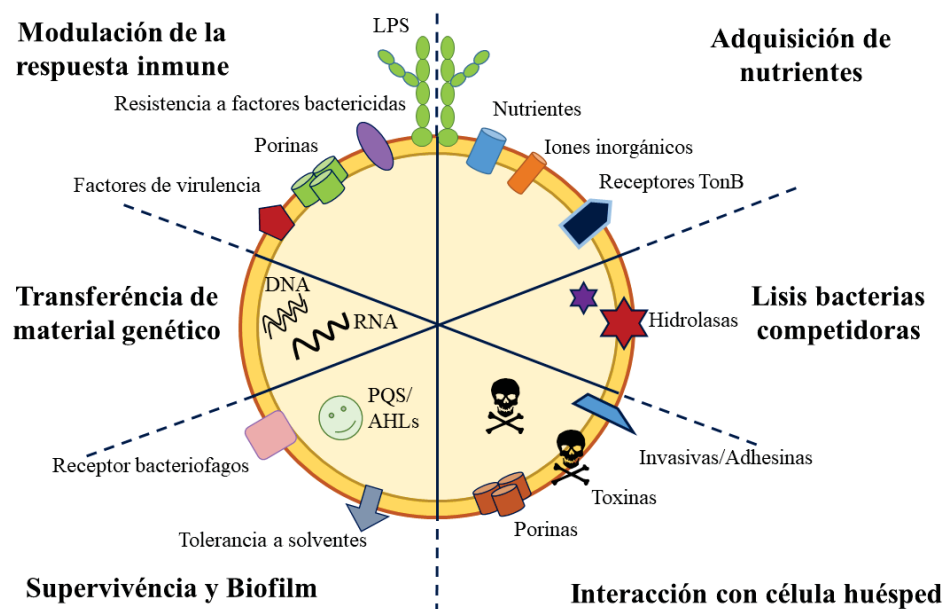
### **1.2.5 OMVs en la transferencia de material genético.**

Se han publicado varios estudios donde se ha detectado material genético en el interior de las OMVs, sugiriendo que podrían desempeñar un papel importante en la transferencia horizontal de genes entre especies bacterianas. La presencia de DNA tanto de origen plasmídico como cromosómico, se ha descrito en OMVs producidas por cepas de importancia clínica, como *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* y *Yersinia pestis*, entre otras (Dorward & Garon, 1990; Kahn et al., 1983; Renelli et al., 2004).

Además, en algunas especies se ha descrito la transferencia lateral de genes mediada por OMVs. Los primeros trabajos publicados fueron en *Neisseria gonorrhoeae* y demostraron que las OMVs eran capaces de vehicular plásmidos de resistencia a penicilina (Dorward et al., 1989). Más tarde, en *E. coli* O157:H7 se descubrió que las OMVs también vehiculizaban genes de virulencia, concretamente aquellos que codificaban para la toxina shiga (*stx1* y *stx2*) (Kolling & Matthews, 1999). Posteriormente, se comprobó que las mismas vesículas de *E. coli* O157:H7 eran capaces de transferir estos genes a otras especies de enterobacterias, como *Salmonella enterica* serovar Enteritidis o *E. coli* JM109. Asimismo, se demostró que las vesículas de *E. coli* O157:H7 infectada por un bacteriófago, podían transferir el DNA viral permitiendo la replicación del fago en nuevas bacterias receptoras (Yaron et al., 2000). También en cepas multi-resistentes de *Acinetobacter baumannii*, se confirmó la transferencia de plásmidos que codificaban para resistencias a carbapenemas mediante OMVs. Éste último descubrimiento fue bastante relevante debido a que *A. baumannii* actúa como cepa reservorio de resistencias a antibióticos en ambientes hospitalarios (Rumbo et al., 2011).

Por lo tanto, la presencia de DNA dentro de OMVs y la transferencia de éste DNA podrían suponer un nuevo mecanismo de transferencia lateral de genes claramente distinto a los tradicionales como son la transformación, conjugación o transducción.

Además de las citadas funciones, las OMVs estarían involucradas en otras que han sido recopiladas en diferentes revisiones bibliográficas, aunque cabe destacar que todas ellas están relacionadas con la transferencia de diversas moléculas, con la finalidad de promover la interacción de la célula secretora con su entorno (Fig. 1.1)



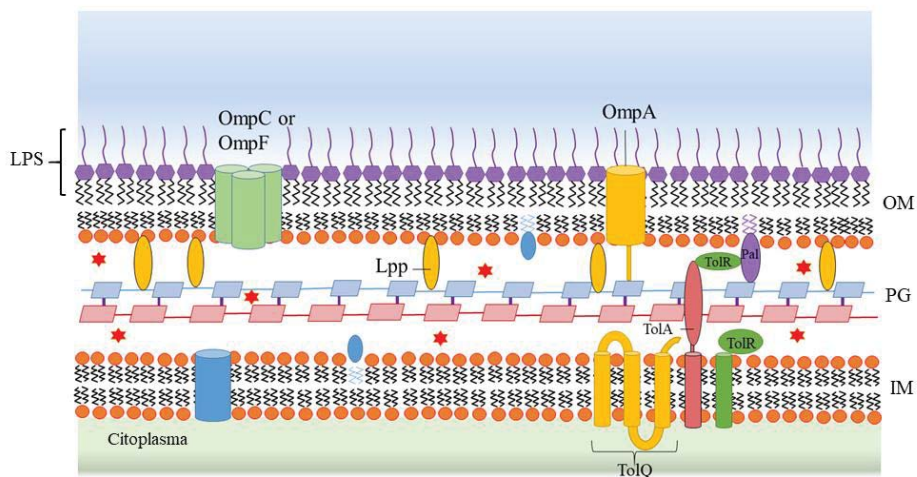
**Figura 1.1.** Esquema de las funciones fisiológicas y patológicas de las OMVs de bacterias gramnegativas. (Adaptación de Lee EY et al., 2008).

### 1.3 BIOGÉNESIS DE LAS OMVS.

La formación de las OMVs tiene lugar en las envueltas celulares de las bacterias gramnegativas (Fig. 1.2), que están compuestas por una doble bicapa lipídica, formada por la **membrana externa** (OM) y la **membrana interna** (IM), que delimita el citoplasma celular. La OM se encuentra en contacto con el medio exterior y se trata de una bicapa lipídica asimétrica, ya que su cara interna está compuesta por fosfolípidos, mientras que la cara externa está formada por glicolípidos, donde encontramos el

**lipopolisacárido bacteriano (LPS)**. El LPS está compuesto por tres partes: el lípido A que es un disacárido de glucosamina con seis o siete cadenas de ácidos grasos que anclan la estructura a la membrana, una región constante de oligosacáridos y el antígeno O, formado por un polisacárido de naturaleza muy variable y que confiere carga negativa a la envuelta bacteriana.

Entre la OM y la IM encontramos el **periplasma (P)** bacteriano que contienen una elevada cantidad de proteínas y donde se sitúa la fina malla de **peptidoglicano (PG)**, que conforma la tercera capa de la envuelta de una bacteria gramnegativa (Beveridge, 1999). A lo largo de toda la envuelta bacteriana encontramos diferentes proteínas estructurales que estabilizan los diferentes componentes. Con pocas excepciones, las proteínas de la OM se pueden dividir en dos clases: las **proteínas integrales transmembrana** denominadas OMPs (*outer membrane proteins*), con conformación de barril  $\beta$  y formadas por varias subunidades formando un cilindro que permite el paso de moléculas y a su vez, ejercen funciones estructurales estabilizando la envuelta bacteriana. El otro grupo de proteínas de la OM son las **lipoproteínas** que no suelen ser proteínas transmembrana, sino que generalmente se unen a la cara más interna de la OM y la anclan al PG; el ejemplo más conocido sería la Lipoproteína de Braun (Lpp) (Silhavy et al. 2010).



**Figura 1.2. Esquema de la envuelta de una bacteria gramnegativa.** La envuelta está formada por la membrana externa (OM) y la membrana interna (IM), y entre ellas, encontramos peptidoglicano (PG) situado en el periplasma. El PG está compuesto por repeticiones de disacáridos, formados por N-acetil-glucosamina y N-acetil-murámico (NAG-NAM) unidos mediante enlaces peptídicos. También encontramos proteínas, que pueden ser solubles en el periplasma (estrella), de transmembrana (cilindros) o lipoproteínas (ovales). La estabilidad de la envuelta bacteriana es mantenida por diversas uniones: uniones covalentes, como la que establece la lipoproteína de Braun (Lpp) en la OM con el PG; uniones no covalentes, como la establecida

entre la proteína transmembrana OmpA con el PG, o por el complejo *tol-pal*, formado por: TolA, TolB, TolQ (Adaptado de Schwechheimer & Kuehn, 2015).

Las OMVs se producen a partir de una protuberancia de la OM que promueve la encapsulación de contenido del periplasma en su interior. Este modelo fue propuesto a partir de visualizaciones realizadas por microscopía electrónica de transmisión, donde se observaron unas estructuras esféricas formadas por una bicapa lipídica y que encapsulaban un material más electrodenso que el del exterior de la vesícula. La bicapa lipídica de las OMVs presentaba el mismo patrón de tinción que la OM bacteriana y el lumen de las OMVs tenía la misma densidad electrónica que el periplasma bacteriano. Estudios posteriores, permitieron comparar la composición proteica y lipídica de las OMVs con la OM bacteriana determinando que existían diferencias y por tanto, indicando que la vesiculación no sería un proceso aleatorio, sino que se generarían mediante un mecanismo bien regulado (Kulp & Kuehn, 2010). El mecanismo por el cual se producen las OMVs continúa siendo desconocido, aunque al derivar de la envuelta bacteriana, se considera que los elementos que mantienen la estabilidad de la misma, participarían en el proceso de vesiculación (Kulp & Kuehn, 2010; Schwechheimer & Kuehn, 2015; Haurat et al., 2010; J. Lee et al. 2016; J. Li, Azam, & Zhang, 2016; Kulkarni & Jagannadham, 2014; Yu et al., 2017)

Se han propuesto varios modelos de vesiculación que se exponen a continuación.

### **1.3.1 Modulación de las uniones proteicas presentes en la envuelta bacteriana.**

Varios modelos publicados sugieren que la liberación de OMVs se produce en aquellas zonas de la célula en las que se ocasiona una disminución temporal en el número de uniones que mantienen estable la estructura de la envuelta bacteriana (Deatherage et al., 2009). La asociación de los diferentes componentes de la envuelta, formada por OM, PG y IM, se mantiene gracias a la presencia de diferentes complejos de proteínas integrales de membrana (Fig. 1.3, A). Estudios moleculares han detectado que la delección de dichas proteínas conlleva a una mayor secreción de vesículas (Kulp et al., 2015; McBroom et al., 2006). Uno de los ejemplos más estudiados han sido el que afecta al complejo de transmembrana *tol-pal*, que es un conjunto de lipoproteínas que mantienen el PG asociado a la OM y a la IM mediante uniones no-covalentes, juntamente con la porina OmpA. Simultáneamente, también participa de este complejo la Lipoproteína de Braun (Lpp) que permiten establecer uniones covalentes entre el PG y la OM, con el fin de



salvaguardar la integridad de la membrana (Bernadac et al., 1998; Deatherage et al., 2009; Schwechheimer & Kuehn, 2015).

Por tanto, una disminución del número de uniones conllevaría un aumento de la vesiculación. Diversos estudios realizados en cepas mutantes han descrito que la delección de la proteína OmpA comporta un aumento de la vesiculación en las cepas *A. baumannii*, *Salmonella spp* y *Escherichia coli* (Schwechheimer & Kuehn, 2015). De la misma manera, se ha observado que en *Vibrio cholerae* la disminución de OmpA producida por la sobreexpresión del *small RNA vrrA*, comporta un incremento en el número de OMVs secretadas. Sin embargo, Roier y colaboradores (2015) al analizar la presencia de la porina P5 (homóloga a OmpA) en muestras de OM y OMVs obtenidas de la cepa salvaje de *Haemophilus influenzae* no observaron ninguna diferencia, sugiriendo que los elementos implicados en la vesiculación podrían ser distintos entre especies diferentes.

A modo de conclusión, los autores que defienden este modelo consideran que en condiciones ambientales, los cambios en la frecuencia en las interacciones entre los diversos componentes de la envuelta, tendrían lugar en aquellos puntos donde se está llevando a cabo la remodelación de la pared celular o bien, la división bacteriana. Estimulando la secreción de OMVs. De todos modos, la remodelación de la pared y la división bacteriana son procesos que se dan en condiciones fisiológicas y por lo cual, no deberían afectar a la estabilidad de la membrana. Por tanto, los autores sugieren que la vesiculación, en parte, sería una consecuencia del propio crecimiento bacteriano y también de la reestructuración de la envuelta celular asociada a una respuesta al estrés (Deatherage et al., 2009).

### **1.3.2 Lipopolisacárido bacteriano (LPS).**

Ciertos estudios apuntan a que la desestabilización del LPS induciría la formación de OMVs. En *P. aeruginosa* se ha descrito un mecanismo que involucraría a la molécula PQS (*Pseudomonas Quinolone Signaling*) en la formación de las OMVs. El LPS bacteriano suele presentar un elevado número de cargas negativas que están neutralizadas gracias a la presencia de cationes divalentes que estabilizan la membrana. Pero la molécula PQS, aparte de ser una molécula inductora de sistema de señalización *Quorum Sensing*, es un sideróforo que actúa como agente quelante. Por lo tanto, la secreción de PQS al medio, conllevaría el secuestro de los cationes divalentes, desestabilizando los enlaces iónicos establecidos entre éstos y el LPS, aumentando así la repulsión aniónica y por consiguiente, estimulando la liberación de las OMVs (Fig. 1.3, B) (Mashburn-Warren

& Whiteley, 2006). Recientemente se ha propuesto una revisión de este modelo por el cual la liberación de las vesículas no se daría por un aumento de la repulsión sino por la expansión de la OM producida por el acoplamiento del PQS con el LPS (Florez et al., 2017).

Diversos estudios han indicado que la estructura del LPS también afectaría a la secreción de OMVs (Deatherage & Cookson, 2012). Concretamente, se ha observado que las vesículas secretadas por *P. aeruginosa* están enriquecidas en el LPS serotipo B (Fig. 1.3, C), que presenta un mayor número de cargas negativas en su estructura, respecto al LPS serotipo A que es mayoritario en la célula (Kadurugamuwa & Beveridge, 1995). Por lo tanto, la vesiculación tendría lugar por un aumento de las fuerzas de repulsión, debida a un aumento de las cargas negativas asociadas al LPS serotipo B, produciendo una inestabilidad en la membrana que a su vez generaría el incremento en la vesiculación (Sabra et al., 2003). Asimismo, se ha descrito una menor vesiculación en la cepa *Porphyromonas gingivalis* en la que se ha eliminado el antígeno O del LPS, reduciéndose así las cargas negativas (Haurat et al., 2010). De todos modos, en otro estudio realizado en *P. aeruginosa* donde generan mutantes delecionados para genes que introducen modificaciones en el antígeno-O del LPS bacteriano, no observaron diferencias en los niveles de vesiculación respecto a la cepa salvaje, aunque sí detectaron un cambio en la composición y tamaño de las vesículas secretadas (Murphy et al., 2014).

### 1.3.3. Modificación en la composición de lípidos.

Diversos estudios han resaltado la diferente composición en fosfolípidos de la OM respecto las OMVs y por lo tanto, elementos involucrados en mantener la estructura de la envuelta bacteriana a nivel de composición lipídica, también podrían estar implicados en la vesiculación (Kulkarni et al., 2014; Schwechheimer et al., 2015).

Recientemente se ha propuesto un nuevo mecanismo de biogénesis de vesículas, en el que está implicado el sistema de transporte VacJ/Yrb ABC (ATP-binding cassette), responsable de mantener la asimetría de la OM mediante el transporte de fosfolípidos (Fig. 1.3, E). Una deleción de este sistema conlleva a una acumulación de fosfolípidos en la OM, que conduce a la formación de una vesícula (Roier et al., 2016).

También se ha descrito que modificaciones en el lípido A del LPS influirían en la biogénesis de las OMVs (Fig. 1.3D). Concretamente, se ha observado que en las OMVs de *P. gingivalis*, en condiciones normales de crecimiento están enriquecidas en las formas desaciladas del LPS bacteriano (Elhenawy et al., 2014). Además, se ha descrito en

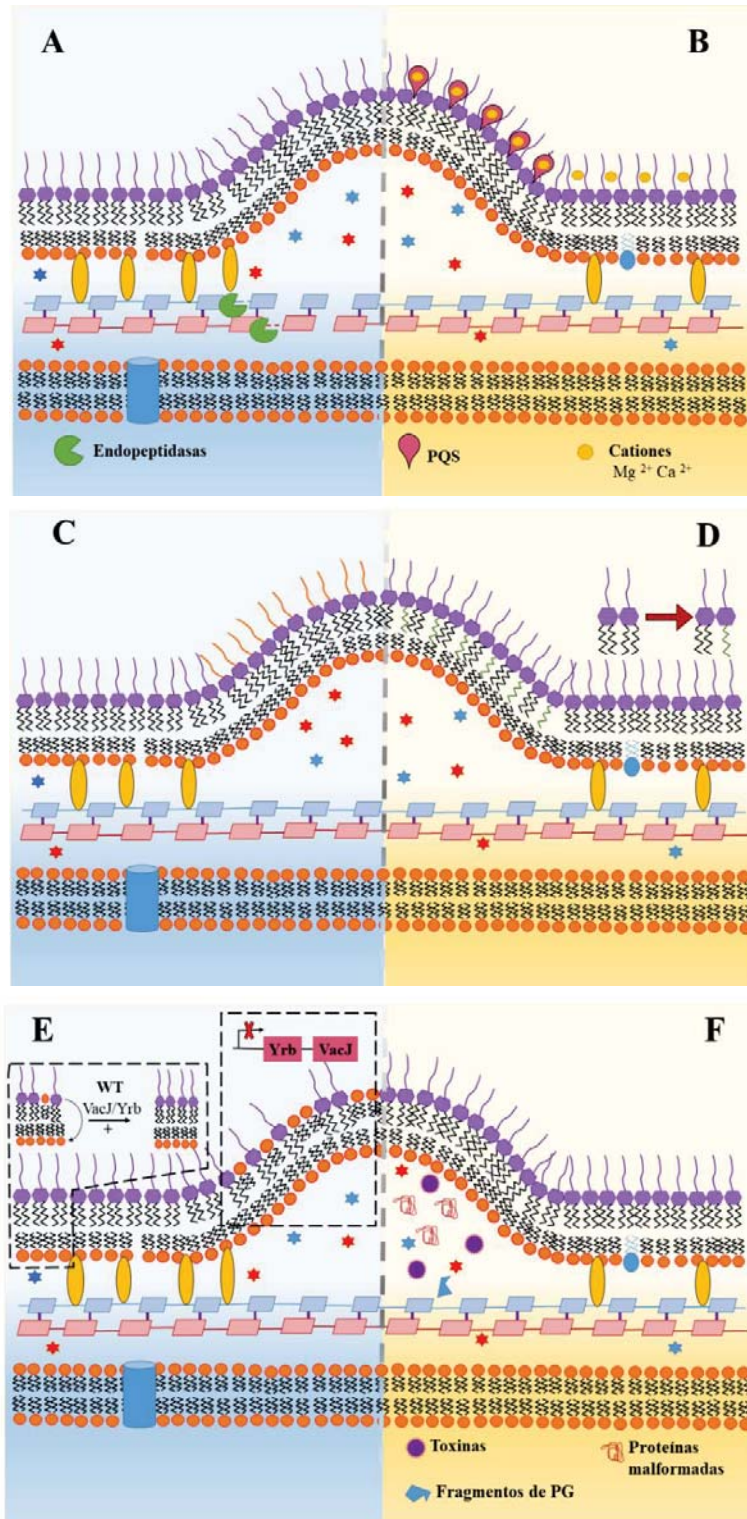
*Salmonella enterica* serovar Typhimurium que el incremento en las formas desaciladas del lípido A del LPS mediante la sobreexpresión de la enzima responsable *PagL* desacilasa, conlleva a un incremento de la vesiculación (Elhenawy et al., 2016). Sin embargo, en las OMVs de *S. enterica* serovar Typhimurium sin inducir, no observaron diferencias en las formas desaciladas del LPS respecto la OM, sugiriendo que el enriquecimiento de las formas desaciladas en OMVs *S. enterica* podría ser un artefacto.

#### **1.3.4. Aumento de la turgencia en el espacio periplásmico.**

Todos los modelos anteriores parten de la observación de que una alteración en la homeostasis de la envuelta bacteriana, conduce a un aumento de la vesiculación. Sin embargo, existe un estudio que permitió sugerir otro modelo. McBroom y colaboradores (2006) demostraron que cepas de *E. coli* mutantes que presentaban una alteración en el sistema de respuesta al estrés (*SOS response*) generaban una gran cantidad de OMVs (Fig. 1.3, F). Este incremento en la vesiculación se atribuyó a la acumulación de proteínas mal formadas en el periplasma, produciendo un aumento de la turgencia en puntos determinados de la OM, generando una curvatura que induciría la formación de la OMVs (Mcbroom & Kuehn, 2007).

En condiciones ambientales, ésta acumulación de material, se daría en aquellos escenarios en los que la célula estaría sometida a un estrés que generaría proteínas con una conformación errónea, y al estar mal plegadas, no serían funcionales, pero si tóxicas para la célula. Por lo tanto, su inclusión en vesículas ofrecería una eliminación selectiva de material no deseado, favoreciendo la supervivencia de la bacteria (Mcbroom & Kuehn, 2007).

El mecanismo de vesiculación como consecuencia del incremento de la turgencia en ciertos puntos de la envuelta, también se ha propuesto para explicar la presencia de fragmentos de PG en el interior de las vesículas. En el periplasma se encuentran los enzimas degradativos del PG denominados autolisinas que participan en procesos de remodelación celular. Éstos enzimas intervendrían en la formación de vesículas mediante la descompactación de la malla de peptidoglicano, que permitiría la incorporación de proteínas del periplasma y la disminución de las uniones con la OM-PG. Simultáneamente, los fragmentos de PG se irían acumulando en el espacio periplásmico, aumentando la turgencia y facilitando la formación de OMVs (Kadurugamuwa & Beveridge, 1996; Zhou et al., 1998).

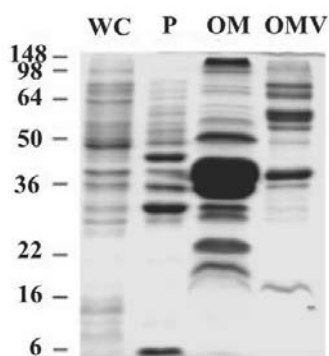


**Figura 1.3. Esquema de los diferentes mecanismos de vesiculación propuestos para bacterias gramnegativas.** (A) Modelo de alteración de la estabilidad de la envuelta por la reducción del número de uniones. (B) Modelo propuesto para *P. aeruginosa*, donde la molécula PQS secuestra iones divalentes, desestabilizando la OM; otra alternativa es que PQS se intercale entre las moléculas de LPS bacteriano, produciendo una expansión de la OM, que acaba liberándose en forma de vesícula. (C) Las OMVs se forman en zonas que presentan un enriquecimiento de un serotipo concreto de LPS que contiene un mayor número de cargas negativas. Las OMVs se forman por un incremento de las fuerzas de repulsión. (D) La expresión del enzima PagL desacilasa, induce la vesiculación, por un enriquecimiento de las formas desaciladas en la OM que se liberarán en las OMVs sin generar una inestabilidad en la envuelta. (E) Mecanismo de biogénesis basado en la acumulación de fosfolípidos en la cara más externa de la OM, en ausencia del sistema de transporte VacJ/YrbABC. (F) La vesiculación se genera debido a un enriquecimiento de proteínas en determinados puntos del periplasma, generando un incremento la turgencia e induciendo una curvatura de la OM (Adaptado de Schwechheimer & Kuehn, 2015).

#### 1.4 COMPOSICIÓN DE LAS OMVs.

Las vesículas de membrana al originarse a partir de la superficie bacteriana, están constituidas principalmente por lípidos y proteínas procedentes de la membrana externa. Además, engloban contenido del periplasma, quedando excluidos componentes procedentes del citoplasma bacteriano y de la membrana interna.

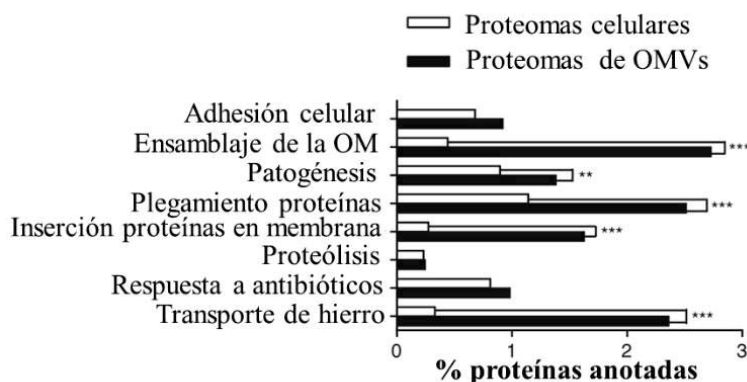
Los estudios sobre la composición de las OMVs se han centrado principalmente en su



**Figura 1.4. SDS-PAGE, teñido con Comassie.** Lisados celulares (WC), periplasma (P), OM y OMVs. Los perfiles proteicos de OMVs de *E. coli* DH5 $\alpha$  presentan un patrón claramente distinto a OM. (Fuente Lee EY et al., 2007).

contenido proteico. Estudios iniciales comparando la composición de las OMVs respecto a la OM bacteriana mediante geles SDS-PAGE, mostraron que los perfiles de proteínas eran similares, pero no idénticos, ya que ciertas fracciones proteicas estaban enriquecidas en las OMVs, mientras que otras proteínas quedaban excluidas (Fig. 1.4). Por otra parte, se observó la presencia de ciertas bandas en las muestras de vesículas que no eran apreciables en las muestras analizadas de la OM, correspondiéndose con proteínas periplásmicas. Además, mediante Western Blot con anticuerpos específicos se confirmó la composición diferencial de las OMVs con la OM, demostrando que las OMVs son una identidad completamente diferente a simples fragmentos de OM (Kulp & Kuehn, 2010; Lee EY et al., 2008; Wai et al., 2003).

Posteriormente, se han realizado numerosos estudios proteómicos en OMVs purificadas por ultracentrifugación mediante gradientes de densidad, que han proporcionado información vital sobre su función y biogénesis. El conjunto de proteínas identificadas en las diferentes proteómicas de OMVs, se encuentran recopiladas en la base de datos EVpedia (<http://evpedia.info>), y se pueden agrupar por su función biológica según la clasificación proporcionada en la base de datos eggNOG (*evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups*). Generalmente en los estudios proteómicos se identifican proteínas estructurales de membrana externa (OmpA, OmpC o OmpF) y proteínas relacionadas con el ensamblaje de los diferentes componentes de la membrana. También se suelen encontrar proteínas relacionadas con el transporte de sustancias como hierro, además de chaperonas y enzimas metabólicas (Fig. 1.15).



**Figura 1.5. Comparación de las funciones realizadas por las proteínas identificadas en estudios proteómicos de OMVs y el correspondiente extracto celular.** Las barras blancas y negras corresponden a los porcentajes de proteínas anotadas en los diferentes proteomas celulares y sus respectivas OMVs. Test de Fisher p-valor < 0.01 (\*\*) y 0.001 (\*\*\*). (Fuente Lee J. et al 2016).

Cabe destacar, que algunas de las proteínas identificadas con más frecuencia en los análisis proteómicos de OMVs purificadas proceden del citoplasma bacteriano, como es el caso de la chaperona GroEL, el factor de elongación EF-Tu o la RNA polimerasa (Tabla 1.1, Fig. 1.6). Sin embargo, su presencia continúa siendo controvertida y la discutiremos en el Apartado 1.4.1.

**Tabla 1.1. Lista de las 15 proteínas identificadas con mayor frecuencia en los estudios proteómicos de OMVs y recopiladas en EVpedia (Fuente Lee J. et al., 2016).**

Nº	Nombre de la proteína	Nombre del gen
1	Outer membrane proteins and related peptidoglycan-associated lipoproteins	OmpA, Omp4, OprF, Pal, YiaD, YfiB
2	Chaperonin GroEL	GroEL, GroL, GroL1, GroL2
3	Elongation factor Tu (EF-Tu)	Tuf, TufA, TufB
4	Long-chain fatty acid transport protein	FadL
5	ATP synthase, beta subunit	AtpD
6	Elongation factor G (EF-G)	FusA, FusB
7	ATP synthase, alpha subunit	AtpA
8	DNA-directed RNA polymerase, beta' subunit(160 kDa subunit)	RpoC
9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	FkpA
10	Protein TolB	TolB
11	Outer membrane efflux proteins	AprF, CmeC, MtrE, OprM, TolC, YohG
12	Outer membrane protein assembly factors	BamA, Opr86
13	Succinyl-CoA synthetase, beta subunit	SucC
14	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit(140 kDa subunit).	RpoB
15	Glutamine synthetase	GlnA

Otro de los componentes más abundantes en OMVs y posiblemente, el que menos atención ha recibido, son los lípidos. Como la curvatura de las OMVs es mayor que la de la célula, se considera que la composición en fosfolípidos debería ser distinta de la OM (Kulkarni & Jagannadham, 2014).

Estudios realizados mediante cromatografía de capa fina, han determinado que los lípidos predominantes en OMVs son LPS, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y cardiolipina, siendo también los mayoritarios en muestras de OM (Jan, 2017; Nevot, et al., 2006a). De todos modos, hay ciertos lípidos que están en menor proporción y sólo se encuentran asociados a OMVs (Kato et al., 2002). Por otra parte, Tashiro y colaboradores (2011), mostraron que en *P. aeruginosa* el fosfolípido mayoritario en OMVs era la fosfatidiletanolamina, mientras que en muestras de OM era el fosfatidilglicerol. Asimismo, en este estudio se detectó mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas, una mayor proporción de ácidos grasos saturados en OMVs, respecto a la OM.

La incorporación de otros componentes distintos a lípidos o proteínas ha sido descrita en muestras de OMVs, destacando la encapsulación de ácidos nucleicos, como DNA y moléculas señalizadoras del cuórum, como PQS y AHL (Mashburn & Whiteley, 2005; Toyofuku et al., 2017).

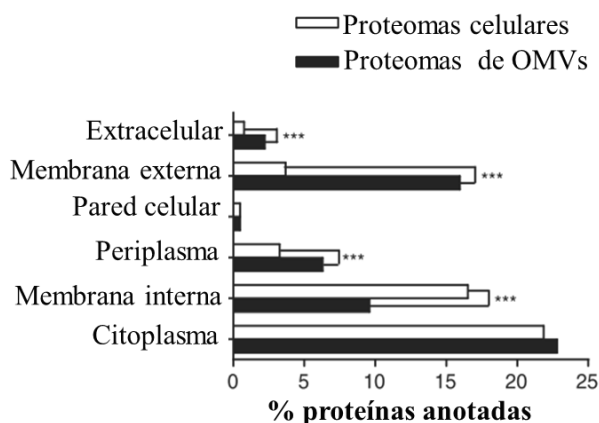
#### 1.4.1 Presencia del contenido del citoplasma en OMVs.

Tal como hemos explicado, las vesículas se generan a partir de protuberancias de la OM y encapsulan contenido procedente del periplasma. Como resultado, una OMV no debería contener material procedente del citoplasma o de la IM. Sin embargo, los estudios bioquímicos y proteómicos han puesto de manifiesto la constante presencia de dichos componentes en muestras de vesículas (Kulkarni & Jagannadham, 2014; Lee EY et al., 2008; Schwechheimer & Kuehn, 2015).

Inicialmente, se consideraba que el material procedente del citoplasma se originaba durante la lisis celular y su detección se debía a una mala preparación de la muestra (Kulp & Kuehn, 2010). Sin embargo si este fuera siempre el caso, no podría explicar cómo algunas de las proteínas más abundantes del citoplasma no se encuentran en vesículas (Lee EY. et al., 2007; Lee J. et al., 2016). Así pues, en la actualidad se considera que el material procedente del C y IM son componentes constitucionales de las OMVs y su presencia se ha descrito en vesículas procedentes de diferentes bacterias patógenas como *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Francisella novicida* y *Neisseria meningitidis* (Choi et al., 2011; Kwon et al., 2009; Lappann et al., 2013; Mullaney et al., 2009; Pierson et al., 2011; Sharpe et al., 2011; Toyofuku et al., 2012).

Además, una reciente revisión realizada por Lee J. y colaboradores (2016) donde se analiza la localización subcelular de todas proteínas identificadas en los 57 estudios proteómicos incluidos en la base de datos EVpedia, pone de manifiesto la presencia ubicua de proteínas de citoplasma en muestras de OMVs (Fig. 1.16). Cabe destacar que la mayoría de proteínas encontradas en los diversos estudios publicados proceden del citoplasma bacteriano (~22%), frente al 15% procedentes de la OM. Ahora bien, esto hace referencia al total de proteínas identificadas, es decir, a la diversidad. Mientras que si sólo se tiene en cuenta la abundancia relativa de proteínas, las localizadas en la OM son indiscutiblemente las mayoritarias (Choi et al., 2011).





**Figura 1.6. Comparación de las diferentes localizaciones subcelulares de las proteínas identificadas en estudios proteómicos de OMVs y lisados celulares.** Las barras blancas y negras corresponden a los porcentajes de proteínas anotadas en los diferentes proteomas celulares y sus respectivas OMVs. Test de Fisher p-valor < 0.01 (\*\*) y 0.001 (\*\*\*). (Fuente Lee J. et al 2016).

También se han encontrado en OMVs, otros componentes citoplásmicos distintos a proteínas. Como hemos explicado anteriormente, la presencia de DNA ha sido descrita en vesículas de numerosas bacterias gramnegativas. Los estudios sugieren que éste se encontraría en el interior de las OMVs ya que el DNA asociado a vesículas es resistente al tratamiento externo con DNAsas (Renelli et al., 2004; Rumbo et al., 2011). Además, se ha observado que las OMVs vehiculizan la transferencia de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos, representando el cuarto mecanismo de transferencia lateral de genes entre bacterias (Tran & Boedicker, 2017).

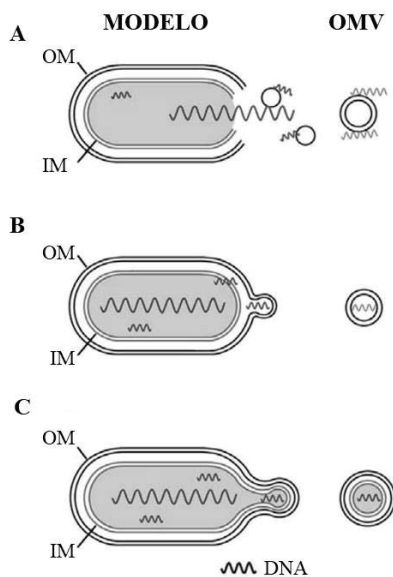
De todos modos, a pesar de la trascendencia de este hecho, el mecanismo por el cual el material genético es encapsulado en las OMVs de estas bacterias sigue siendo una incógnita.

#### 1.4.2 Modelos de incorporación del DNA en OMVs.

Se han planteado diferentes modelos para explicar la presencia de DNA en OMVs (Berleman & Auer, 2013). El primer modelo, propone que el DNA presente en el medio extracelular debido a la lisis bacteriana, podría ser internalizado en vesículas por un

mecanismo parecido a la transformación bacteriana (Fig. 1.7, A). El segundo, propone que el DNA sería incorporado en la vesícula antes de ser liberada. En este modelo, el DNA lograría traspasar la IM de la bacteria y llegar al periplasma (P), donde sería incorporado en el interior de la OMVs antes de su liberación (Fig. 1.7, B) (Renelli et al., 2004).

El último modelo, sugiere que durante el proceso de vesiculación se incorpora el contenido citoplasmático a partir de la protuberancias conjunta de la OM como de la IM (Jagath L Kadurugamuwa & Beveridge, 1995a). Este modelo supondría un nuevo mecanismo de biogénesis de vesículas en el que se generaría un nuevo tipo de vesícula formada por una doble bicapa lipídica (Fig. 7C).



**Figura 1.7. Modelos de inclusión de DNA propuestos.** (Fuente propia C. Pérez-Cruz.)

De todos los modelos propuestos, tan sólo el primero ha sido probado, mientras que no existen evidencias que confirmen los otros dos. El hecho de que no exista realmente una explicación probada de cómo componentes citoplasmáticos son incorporados al interior de una vesícula, ha hecho que la relevancia de la presencia de DNA en vesículas sea reducida a una simple anécdota.

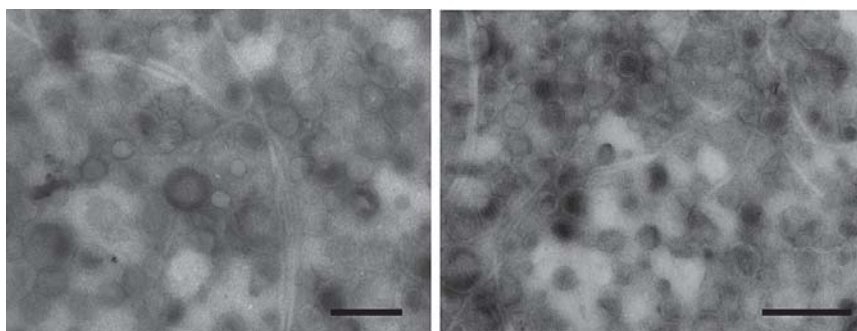
Recientemente, se ha propuesto un nuevo modelo de incorporación del DNA en OMVs de *P. aeruginosa*. La encapsulación del DNA tendría lugar mediante la lisis de la bacteria por profagos, que generaría fragmentos de membrana que al recircularizarse incluirían el DNA liberado durante la lisis bacteriana (Turnbull et al., 2016).

### 1.5 VISUALIZACIÓN DE OMVS MEDIANTE TEM.

Debido a su pequeño tamaño, la visualización de OMVs en el microscopio óptico es imposible y seguramente por esta misma razón, su existencia pasó inadvertida durante años. En 1966, Work y colaboradores describieron la presencia de fragmentos membranosos circulares en los sobrenadantes de *E. coli* cultivada en condiciones limitantes de lisina utilizando un microscopio electrónico (Kulp & Kuehn, 2010). Por lo tanto, el desarrollo de la microscopía electrónica permitió la caracterización estructural de las OMVs, describiéndolas como unas estructuras esféricas con un diámetro comprendido entre 20-300 nm, compuestas por una bicapa lipídica y que encapsulan un material más electrodensito que el exterior de la vesícula, confirmando que no se tratan de simples “sacos vacíos” (Beveridge, 1999).

En la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la imagen es obtenida al hacer pasar a través de la muestra un haz de electrones que posteriormente es recogido en un sensor. La imagen se obtiene por el contraste generado debido al diferente grado de absorción de electrones que presentan los distintos componentes de la muestra. Para que el haz de electrones pueda atravesar la muestra, ésta no debe tener un grosor superior a 100 nm y es necesario incrementar el contraste de la muestra con metales pesados, con el fin de facilitar la visualización. Además, la muestra debe estar deshidratada para tolerar la exposición a los electrones.

Generalmente, la caracterización microscópica de OMVs se realiza mediante TEM de tinciones negativas, en las que una suspensión de vesículas es depositada sobre una rejilla que actúa como soporte y permite su adhesión. Seguidamente, la muestra es contrastada con acetato de uranilo y deshidratada a temperatura ambiente (>24h). Las muestras son visualizadas directamente en microscopio sin necesidad de realizar cortes ultrafinos, ya que las OMVs presentan un mínimo grosor (~100 nm), permitiendo la transmisión de electrones.



**Figura 1.8.** Tinciones negativas de vesículas aisladas de *Pseudomonas PAO1*. Barra 200 (izquierda). Barra 250 nm (Derecha) (Fuente propia C. Pérez-Cruz).

Esta técnica es muy útil para determinar la presencia de vesículas en una muestra, o bien la pureza de las preparaciones de OMVs, al poder descartar la presencia de flagelos, restos celulares o virus que puedan interferir en los resultados (Fig. 1.8). Pero sobretodo, las principales ventajas son que permite un procesado de la muestra sencillo, rápido y que no requiere de personal experimentado. Como contrapartida, si se pretende caracterizar la estructura de las OMVs y de las bacterias secretoras, la tinción negativa no dispone de la suficiente sensibilidad ya que la muestra presenta cierto grosor. Además, debido a la deshidratación de la muestra, la membrana tiende a contraerse observando en la TEM de tinciones negativas, que las vesículas presentan cierta alteración en su estructura (Klimentová & Stulík, 2015).

Por lo tanto, se recomienda el uso de la TEM de cortes ultrafinos para la caracterización de vesículas de membrana y las envueltas celulares de las bacterias (Beveridge, 1999; Schooling & Beveridge, 2006).

### **1.5.1 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) de cortes ultrafinos.**

Como hemos explicado previamente, el principio de la visualización de especímenes biológicos mediante TEM se basa en hacer incidir un haz de electrones a través de la muestra y la señal es recogida por un sensor que convertirá los electrones recogidos, en imagen. Esto obliga a que la muestra no tenga un grosor superior a 100 nm y que esté deshidratada para tolerar la exposición a los electrones. Por último, es necesario aplicar tinciones con metales pesados que se unirán a los diferentes componentes de la muestra, incrementando el contraste y aumentando la resolución de la técnica.

Para la visualización de bacterias mediante TEM, al presentar un diámetro cercano a 0,5  $\mu\text{m}$  es imprescindible la realización de cortes o secciones de la muestra. Para su preparación, la muestra es fijada y seguidamente el agua es sustituida por un disolvente que permitirá la inclusión de la muestra en resinas para la realización de las secciones. Este proceso es laborioso y requiere de personal experimentado.

A continuación, introduciremos los dos métodos existentes para la preparación de los cortes ultrafinos y sus ventajas e inconvenientes.

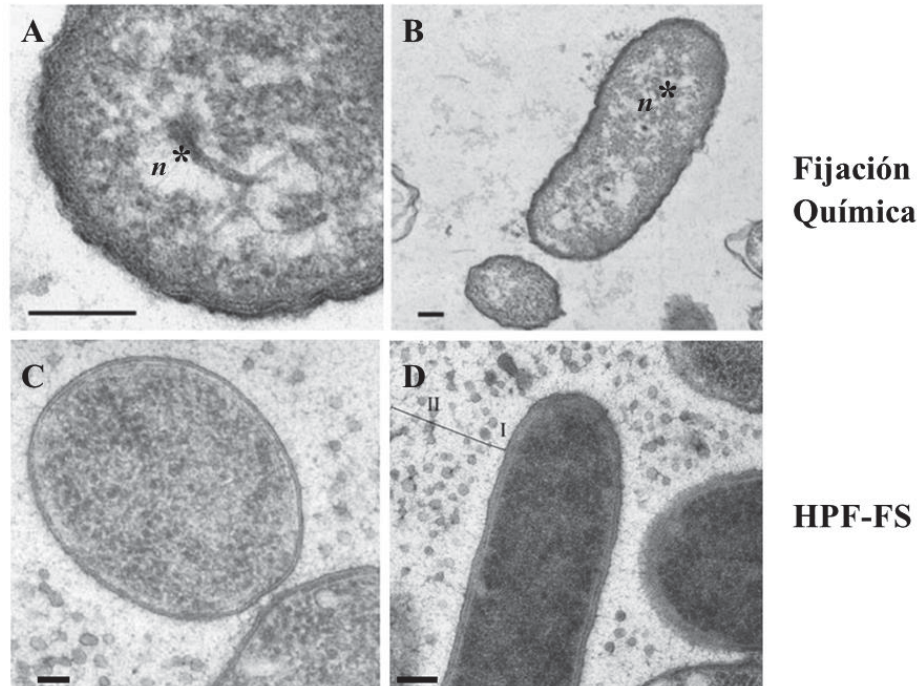
#### *1.5.1.1 TEM de cortes ultrafinos obtenidos mediante métodos convencionales.*

En los métodos convencionales la fijación se realiza mediante métodos químicos, utilizando reactivos como el glutaraldehído o el tetraóxido de osmio ( $\text{Os}_4\text{O}_4$ ). Éstos actúan incrementando el número de enlaces covalentes entre los diferentes componentes biológicos de la muestra, permitiendo mantener la estructura celular tras la sustitución del agua por disolventes orgánicos y la posterior inclusión en resinas para su corte. Todo este proceso se realiza a temperatura ambiente.

Esta técnica presenta la ventaja de que los protocolos están muy estandarizados y permite la observación de los especímenes biológicos con un alto contraste. De hecho en el pasado, contribuyó ampliamente al conocimiento de la morfología celular bacteriana, describiendo la pared de bacterias grampositivas y gramnegativas, la existencia de fimbrias, flagelos, microcompartimentos y quimiorreceptores entre otras estructuras (Hurbain & Sachse, 2011; Pilhofer, Ladinsky, McDowall, & Jensen, 2010).

Sin embargo, el uso de fijadores químicos, la deshidratación y el uso de agentes potenciadores del contraste alteran indiscutiblemente la estructura fina de la célula. Además, acarrea la formación de artefactos que pueden generar cierta confusión. Como ejemplo de esto, en los años 50 se describió la estructura denominada “mesosoma”, que consistía en invaginaciones de la membrana interna o citoplasmática, a la que se atribuyeron múltiples funciones. Más tarde, gracias a la mejora en las técnicas de fijación se confirmó que estas estructuras eran simples artefactos. Otro ejemplo de artefactos generados por fijación química consistiría en la clásica estructura del nucleoide bacteriano descrito, mediante TEM convencional, como una “vacuola” formada en su interior por fibras de DNA (Fig. 1.19. A-B). Esta estructura “vacía” en el citoplasma era generada durante la fijación y sustitución de la muestra y no se corresponde con la visión

actual que tenemos del nucleóide bacteriano (Fig. 1.19, C) (Eltsov & Zuber, 2006; Pilhofer et al, 2010).



**Figura 1.9. Micrografías de *Pseudoalteromonas antarctica* NF3<sup>T</sup>, comparando los dos métodos de preparación de muestras para su visualización en TEM. En la figura A y B el espacio extracelular se encuentra vacío y no se observa la presencia de material capsular. En las imágenes de HPF-FS, se observan abundantes OMVs (C,D) y además en la figura D, se visualiza la cápsula bacteriana (I) que rodea completamente la bacteria y a continuación empieza la matriz extracelular (II). Además, en la fijación química vemos espacios vacíos en el citoplasma que corresponden al nucleóide bacteriano (n\*), mientras que en las muestras de HPF-FS no están presentes, confirmando que se trata de un artefacto de la fijación química. Barra de 100 nm (A,B,D) barra 50 nm (C). (Adaptado de Nevot et al. 2006b.)**

Por otra parte, la preparación de la muestra mediante fijación química no permite la preservación de la matriz extracelular polimérica (EPS) que rodea a la bacteria y que contiene abundantes OMVs. Esto se debe, a que la matriz está compuesta mayoritariamente por agua (95%) y el EPS es una estructura laxa y extremadamente hidratada. Por lo que el uso de fijadores químicos no consigue estabilizar el polímero. Durante la sustitución en la que se infiltra la muestra con disolventes (etanol o acetona), se produce un desplazamiento del agua presente y que arrastra todos aquellos

componentes altamente hidratados. Por este motivo, lo que observamos mediante TEM convencional es que la matriz extracelular de los especímenes se encuentra colapsada y alterada en la zona más cercana a la célula, mientras que el espacio intercelular se encuentra exento de material (Fig. 1.9, B) (Nevot, et al., 2006b). Mientras, que la misma cepa bacteriana fijada con otros métodos que consiguen una mayor preservación de la estructura bacteriana y el material extracelular, se observa una elevada cantidad de OMVs (Fig. 1.9, D).

Por lo tanto, la estructura de la matriz extracelular entendida como una extensa malla de polímero fue asumida, pero nunca visualizada hasta que fueron desarrolladas las técnicas de *High-Pressure Freezing* y *Freeze Substitution* (HPF-FS) (Hunter & Beveridge, 2005).

#### *1.5.1.2 TEM de muestras preparadas por criofijación y criosustitución.*

Para la visualización de vesículas y de las matrices extracelulares bacterianas en cortes ultrafinos para su posterior visualización mediante TEM, se recomienda la preparación de las muestras mediante criofijación y criosustitución (*High-Pressure Freezing*, *Freeze Substitution*, HPF-FS).

La microscopía de transmisión de cortes ultrafinos de muestras preparadas mediante criofijación a alta presión (*High-Pressure Freezing*, HPF) consiste en inmovilizar los especímenes mediante la aplicación de temperaturas por debajo de las del nitrógeno líquido en cuestión de milisegundos y ejerciendo una presión elevada. Por lo tanto, la muestra es fijada mediante métodos físicos en el que los especímenes biológicos son inmovilizados mediante una congelación rápida, a temperaturas extremadamente bajas (< -190°C) y a altas presiones. Todo ello genera que el agua presente en la muestra solidifique en un estado amorfo, evitando la formación de cristales que alterarían la estructura nativa de la célula, obteniendo “hielo vítreo”. Este proceso de fijación de especímenes biológicos a temperaturas extremadamente bajas y altas presiones, se lo conoce como vitrificación. Además, la congelación de la muestra permite detener todos los procesos biológicos en cuestión de milisegundos (Dubochet, 2007; 2012).

Una vez criofijada, el agua de la muestra es substituida por disolventes también a muy bajas temperaturas (<90°C) evitando la recristalización del agua e imposibilitando el arrastre o desplazamiento de los componentes. Durante este proceso denominado de criosustitución, se infiltra la muestra con solventes y fijadores químicos (glutaraldehído o tetraóxido de osmio) para fomentar la formación de enlaces covalentes, mientras que

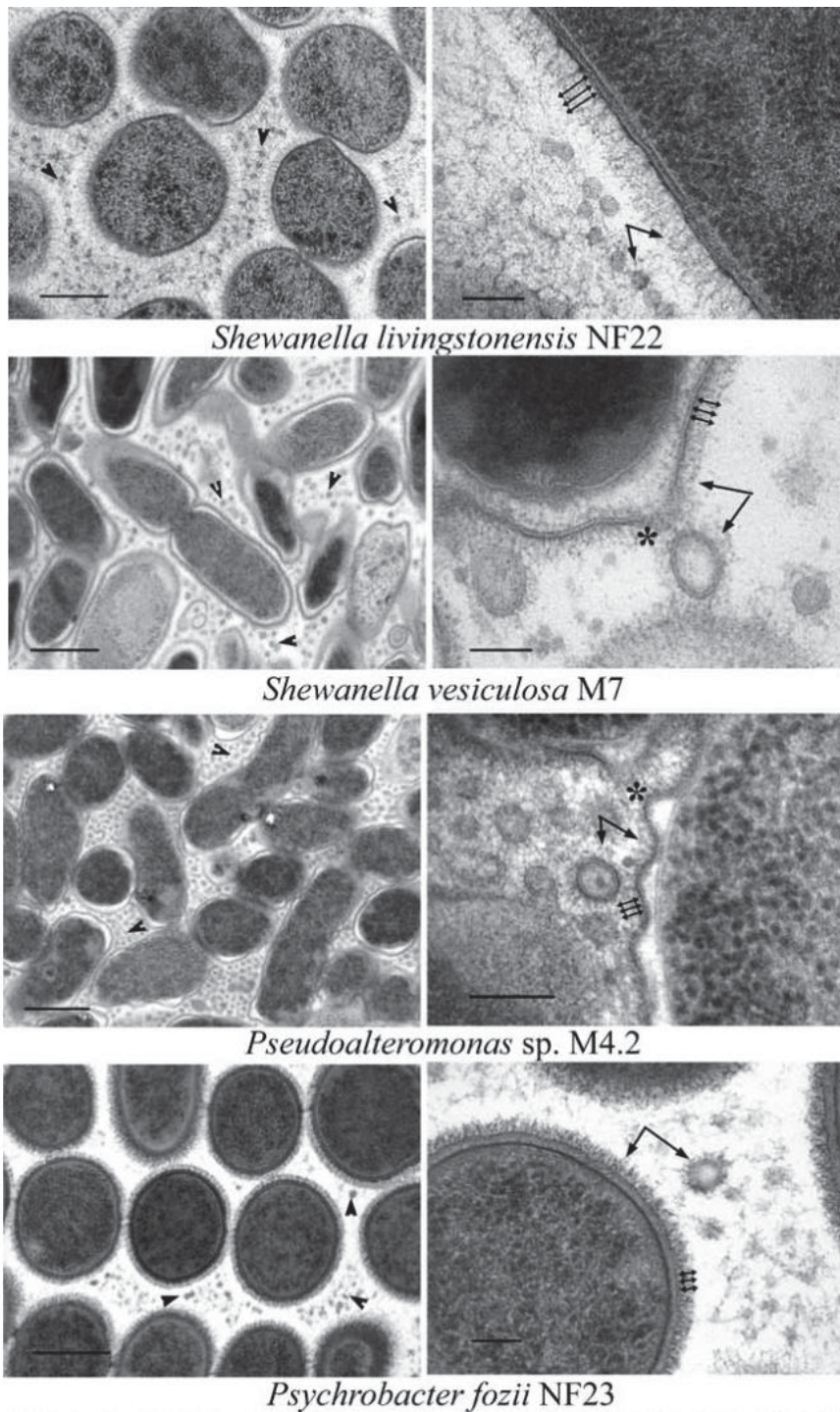
los componentes se encuentran en estado vítreo. De este modo, se consigue un alto grado de preservación de la estructura nativa del espécimen. Por último, la muestra es embebida en una resina para su posterior manipulación a temperatura ambiente. La visualización se realiza en un microscopio de transmisión a temperatura ambiente por lo que se requiere del uso de metales pesados con el fin de incrementar el contraste (Frias et al., 2010; Hunter & Beveridge, 2005; Palsdottir et al., 2009; Schooling & Beveridge, 2006).

Nevot y colaboradores (2006b), demostraron en la bacteria antártica *Pseudoalteromonas antártica* NF3<sup>T</sup>, que las muestras sometidas a fijación química no mostraban material extracelular alrededor de la bacteria o en el espacio intercelular. Sin embargo, cuando la misma cepa fue sometida a HPF-FS, se podía observar un material capsular alrededor de la bacteria con abundante material entre células, en el que destacaba una abundante cantidad de OMVs. Este estudio confirmó, la idea de que para observar la presencia de OMVs en las matrices extracelulares y caracterizar la estructura, tanto bacteriana como vesicular, se requiere como mínimo del uso de TEM de cortes ultrafinos de la muestra obtenidos después de una HPF-FS (Fig. 1.9).

Asimismo, nuestro grupo de investigación ha caracterizado estructuralmente otras cepas ambientales procedentes de la Antártida mediante TEM después de HPF-FS (Fig. 1.10), como *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup>, *Shewanella livingstonensis* NF22<sup>T</sup>, *Psychrobacter fozii* NF23<sup>T</sup>, *Marinobacter guineae* M3B<sup>T</sup> y *Pseudoalteromonas* M4.2., revelando que las matrices extracelulares presentaba una estructura compleja, integrada por una cápsula polimérica adherida a la superficie bacteriana, y por una gran cantidad de OMVs (Frias et al., 2010).

De todos modos, la técnica de HPF-FS requiere de la deshidratación de la muestra y la adición de fijadores y contrastes químicos que pueden perturbar la estructura vesicular y bacteriana. Por lo tanto, aunque en mucho menor grado esta técnica también puede causar la presencia de ciertos artefactos.





**Figura 1.10.** TEM después de HPF-FS de bacterias antárticas. Éstas fueron aisladas a partir de muestras de sedimentos marinos procedentes de la Isla Decepción, Antártida. (Frias et al., 2010.)

### 1.5.1 Criomicroscopia Electrónica (Cryo-EM).

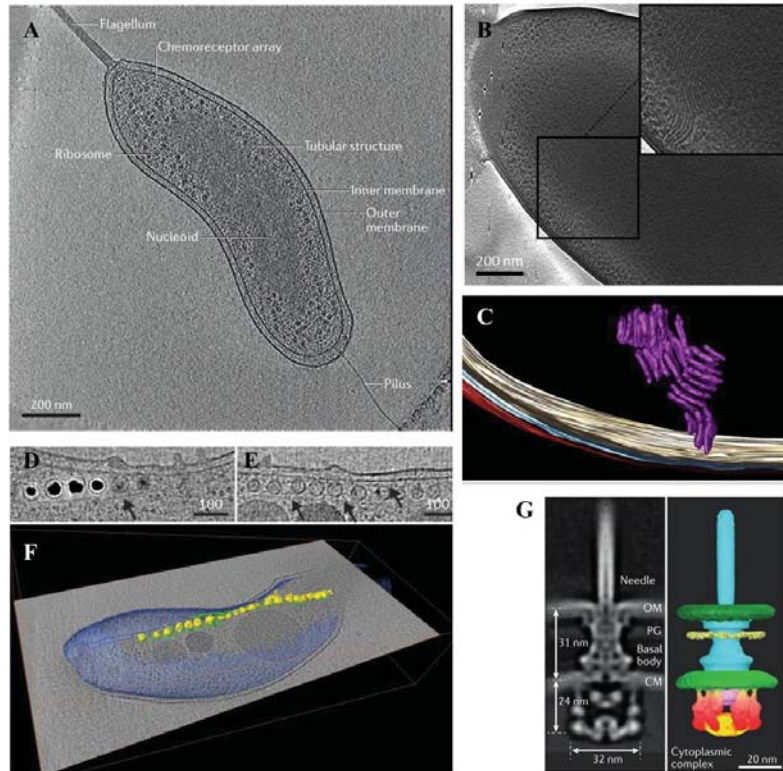
El gran avance en el campo de la microscopia electrónica ha sido el desarrollo de la Criomicroscopia (Cryo-EM), que permite la visualización directa del espécimen vitrificado en un Crio-microscopio a temperaturas de nitrógeno líquido (LN<sub>2</sub>). Evitando la inclusión de la muestra en resinas o bien, la utilización de agentes potenciadores del contraste. Por lo tanto, esta técnica permite la visualización de la muestra lo más cerca posible de la realidad, observándola directamente en su estado máximo de hidratación y sin ser sometida a ningún tipo de procesamiento, evitando a su vez generación de artefactos producidos durante la preparación (Hurbain & Sachse, 2011).

La criofijación (*criofixation*, CF) por “*Plunge freezing*” (PF) fue el primer método desarrollado y consiste en la inmersión de una muestra en un gas licuado. Los gases más utilizados son el etano y el propano, que se encuentran en fase gaseosa a temperatura ambiente, pero ambos se licúan a temperaturas de LN<sub>2</sub> a (-196°C). Estos gases presentan una alta conductividad térmica, lo que permite una rápida transferencia del calor de la muestra al líquido. Para optimizar el intercambio de temperatura y facilitar la vitrificación, éstas deben sumergirse a alta velocidad en el gas licuado, que permanece en LN<sub>2</sub> para asegurar su estado líquido y la temperatura más baja posible. En su conjunto, estas condiciones permiten crioinmovilizar muestras a velocidades del orden de 10<sup>4</sup> °C por segundo, vitrificando el agua presente en la muestra sin dañar las estructuras macromoleculares (Pilhofer et al., 2010).

Uno de los equipos para aplicar el método de PF es el Vitrobot™ (FEI, Eindhoven, The Netherlands), que permite una CF semiautomática, dirigida por ordenador, de suspensiones finas de especímenes biológicos bajo temperatura y humedad controladas. Para ello, se deposita una gota de la suspensión sobre una rejilla y mediante rápido contacto con el papel de filtro (“*blotting*”), se extrae la mayor parte de líquido permaneciendo tan sólo una capa de unos 100 nm de grosor. A continuación, la rejilla se sumerge directamente en el gas licuado y es mantenida a temperaturas de LN<sub>2</sub>, para ser inmediatamente visualizada en el Cryo-EM sin romper la cadena de frío.

La Cryo-EM permite la visualización de especímenes “enteros” directamente en el microscopio, siempre que tengan un tamaño inferior a 0,5 µm. En este rango se encuentran la mayoría de bacterias, arqueas, virus y vesículas. Posteriormente, se pueden realizar reconstrucciones tomográficas de los especímenes vitrificados, estudiando las estructuras en su contexto celular y en condiciones muy similares a las que se

encontrarían en su estado nativo. En conclusión, la Cryo-EM evita los artefactos propios de los procesos de la fijación química, deshidratación, inclusión y contrastado que pueden dar lugar a interpretaciones distorsionadas de la muestra (Delgado et al., 2015).



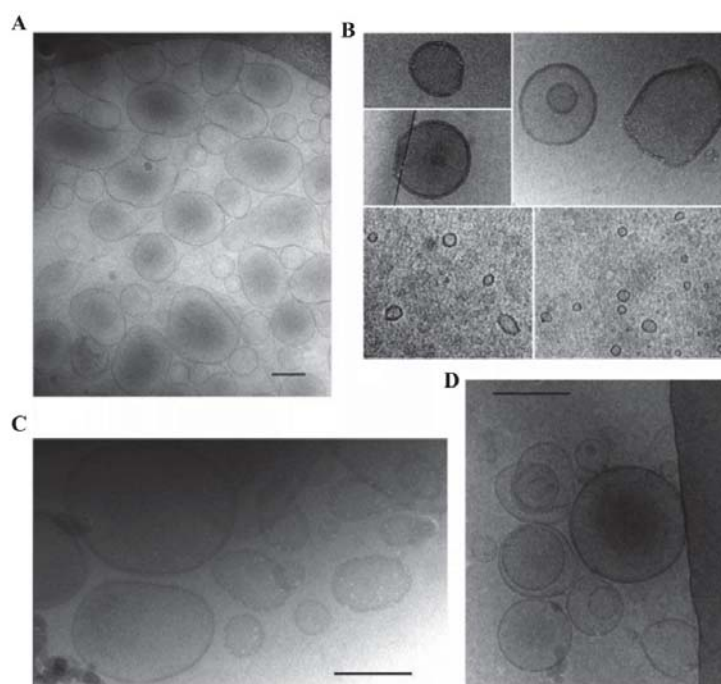
**Figura 1.11. Imágenes de Cryo-EM de diversas estructuras bacterianas.** A) Fragmento de la reconstrucción tomográfica obtenida mediante criotomografía electrónica (CET), en la que *Bdellovibrio bacteriovorus* ha sido criofijado mediante PF y visualizado entero en el Cryo-EM para la realización del tomograma (Adaptado de Oikonomou et al., 2016). B) Tomograma de *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> en el que se observa la presencia de “Stacks”. C) Segmentación parcial del tomograma observado en la imagen B. Lila: los “Stacks”; rojo: OM; azul: peptidoglicano; color crema: PM. (B,C) (Adaptado de Delgado et al., 2015). (D-F) Cadenas de magnetosomas flanqueados por filamentos de citoesqueleto en *Magnetospirillum magneticum* detectados por CET. (D) Cadena de magnetosomas ampliada. (E) Vista similar de magnetosomas formada en ausencia de hierro (ausencia de cristales de magnetita). (F) Organización 3D de los magnetosomas y sus filamentos asociados respecto a la célula completa (Komeili et al., 2006). (G) Reconstrucción del sistema secreción T3SS *Shigella flexneri* ( izquierda) y representación del modelo 3D (derecha) (Oikonomou et al., 2016).

Los estudios publicados que utilizan algunas de las técnicas de Cryo-EM han aportado información relevante sobre ciertos aspectos de la fisiología bacteriana, patogenicidad o interacción célula-célula (Oikonomou et al. 2016). Por ejemplo, gracias a la Cryo-EM se

podieron observar y describir los filamentos del citoesqueleto bacteriano. También ha permitido la revisión de estructuras ya conocidas como membranas y paredes celulares, apéndices superficiales como los flagelos y fimbrias, compartimentos internos y el nucleoide (Fig. 1.11). La Cryo-EM tiene la suficiente resolución para caracterizar estructuras supramoleculares de los diferentes sistemas de secreción bacterianos directamente insertados en la membrana. Por otra parte, el desarrollo de la Cryo-EM ha hecho posible la descripción de nuevas estructuras como el “stack” descubierto en la bacteria antártica *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> y caracterizado por nuestro grupo de investigación (Fig. 1.11, B-C) (Delgado et al., 2015). Un artículo reciente, en el que se ha realizado el estudio estructural de 88 cepas diferentes, muestra imágenes de estructuras novedosas mayormente internas, ampliando nuestro conocimiento sobre la estructura bacteriana (Dobro et al., 2017).

En los últimos años el uso de la Cryo-EM se está extendiendo otros campos, ya que permite realizar análisis automáticos de “single particle” con el fin de caracterizar la estructura 3D de proteínas o complejos macromoleculares embebidos en una suspensión acuosa, desplazando cada vez más el uso de la cristalografía de rayos-X tradicionalmente empleada (Cheng et al., 2015).

En conclusión, la Cryo-EM de vesículas sometidas a *Plunge-Freezing* podría ser una buena técnica para el estudio de la morfología y estructura vesicular. Sin embargo, antes del inicio de la realización de esta tesis los estudios realizados que mostraran vesículas mediante Cryo-EM eran escasos. Tan sólo, un estudio realizado por Baumgarten y colaboradores (2012) mostraron imágenes obtenidas en el Cryo-EM de vesículas aisladas de *Pseudomonas putida* DOT-T1E después de ser sometida a diferentes situaciones de estrés (1-octanol, NaCl, EDTA y choque térmico), obteniendo en cada una de las condiciones una morfología de vesículas distinta (Fig. 1.12). Indicando que la Cryo-EM podría tratarse de una técnica imprescindible para la caracterización estructural de vesículas de membrana.



**Figura 1.12. Imágenes de Cryo-TEM representativas de OMVs de *Pseudomonas putida* DOT-T1E, aisladas de cultivos sometidos a tratamientos con: (A) 1-octanol, (B) NaCl (C) choque térmico y (D) EDTA. Barra de 200 nm. (Figura procedente de Baumgarten et al., 2012).**

## **2. SECRECIÓN DE small RNA MEDIANTE OMVs**

En el capítulo anterior hemos introducido la composición, biogénesis, funciones y observación de las OMVs secretadas por bacterias gramnegativas. A modo de resumen, las OMVs son unas estructuras esféricas (20-300 nm), que actúan como vehículo de transporte de biomoléculas con el fin de promover la interacción con el medio extracelular y las células vecinas. Éstas se originan a partir de la membrana externa y empaquetan contenido del periplasma, aunque está ampliamente aceptado que las vesículas también incorporan contenido del citoplasma, entre ellos material genético. La encapsulación de DNA es la que más atención ha recibido hasta el momento, debido al papel que juegan estas vesículas en la transferencia de resistencias a antibióticos y de factores de virulencia. No obstante, las OMVs también pueden incorporar RNA en su interior.

Dorward y colaboradores (1989) describieron por primera vez la encapsulación de RNA en OMVs de *Vibrio cholerae*. Estos autores observaron que en una extracción de ácidos nucleicos totales procedente de muestras de vesículas y tratada posteriormente con

RNAsas, en el análisis electroforético desaparecían algunas bandas, indicando que el RNA presente había sido degradado. Esta observación pasó desapercibida durante años, pero durante el transcurso de la realización de esta tesis doctoral han sido publicados varios artículos refiriéndose a la encapsulación de RNA. Concretamente, se ha descrito el contenido de RNA asociado a vesículas en las especies *Prochlorococcus spp*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*, mediante el uso de técnicas de secuenciación masiva (RNA-seq), sugiriendo que las OMVs estarían enriquecidas en RNAs no codificantes de tamaños pequeños (Biller et al., 2014; Ghosal et al., 2015; Sjöström et al., 2015).

Este descubrimiento es muy atractivo por varios motivos. Primero, porque se ha descrito que los RNAs no codificantes (*non-coding* RNA, ncRNA) no tienen por finalidad ser traducidos a proteínas, sino que actúan como reguladores esenciales permitiendo a la célula ajustar su fisiología para adaptarse a cambios en el ambiente, realizando una regulación intracelular. En segundo lugar, se ha observado que las vesículas producidas por células de mamíferos, pueden transferir ncRNA a una célula receptora y modificar su expresión génica y, en consecuencia, realizar una regulación intercelular.

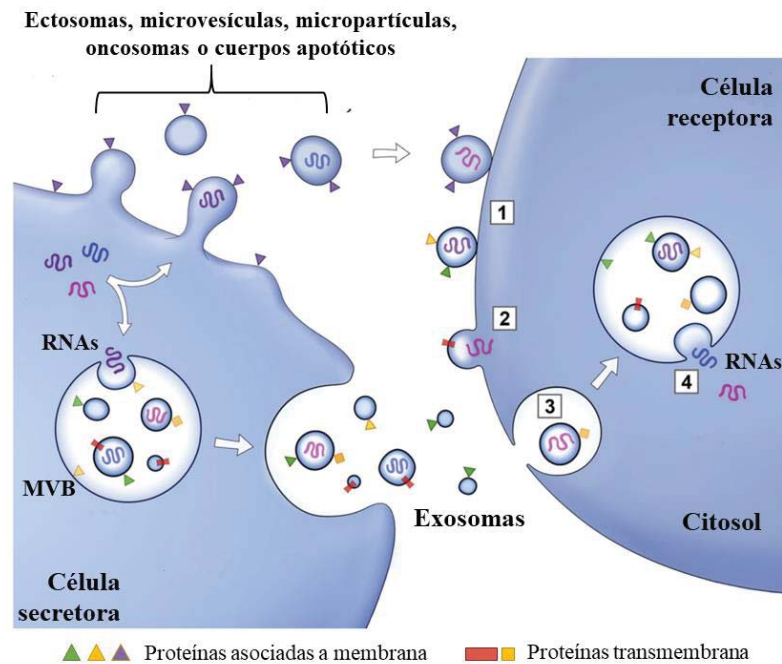
Por último, las bacterias viven formando comunidades multicelulares, denominadas biofilms. Para el correcto funcionamiento del biofilm, las bacterias utilizan una gran variedad de señales interconectadas entre ellas, con el fin integrar o responder conjuntamente a los estímulos que vengan del exterior. Las OMVs promueven la formación del biofilm vehiculizando señales del Quorum Sensing bacteriano (QS). Por otra parte, se han descrito diversos ncRNA que regulan la expresión intracelular de la bacteria modificando el fenotipo para adaptarse a crecer en biofilm. Sin embargo, nunca se ha evaluado el encapsulamiento de ncRNA en vesículas bacterianas para ser transferidos a las células vecinas. Por tanto, estas tres ideas sintetizan el marco que guiará la descripción de los puntos siguientes de la introducción.

## **2.1 SECRECIÓN DE ncRNA EN VESÍCULAS PRODUCIDAS POR CÉLULAS DE MAMÍFEROS.**

En eucariotas, las EVs son secretadas al medio extracelular por una gran variedad de tipos celulares y podemos diferenciar 2 subtipos principales: los **exosomas**, que presentan unos diámetros inferiores comprendidos entre 100-150 nm y se originan en los cuerpos multivesiculares situados en el interior de la célula. Mientras, que las EVs que se originan a partir de la membrana plasmática y presentan una gran disparidad de diámetros (100-



1000 nm), se denominan **ectosomas, microvesículas, micropartículas, oncosomas o cuerpos apoptóticos** (Fig.1.13).



**Figura 1.13. Representación esquemática de los diferentes tipos de vesículas de membrana secretada por las células eucariotas y el modelo de transferencia.** Las EVs se forman por secreción directa desde la membrana plasmática (MP) o en el interior de los cuerpos multivesiculares (*multivesicular bodies*, MVB) que son liberados por fusión con la MP. Durante su formación incorporaran selectivamente proteínas (triángulos y rectángulos) y RNA (Colombo et al., 2014). Las EVs una vez liberadas presumiblemente interaccionan con la membrana plasmática (MP) de la célula receptora (1). Entonces la vesícula puede fusionarse directamente con la MP (2) o bien, será endocitada al interior de la célula receptora (3). Posteriormente, las EVs se fusionarán con la membrana del compartimento endocítico, facilitando la liberación del contenido al citosol de la célula receptora (4). Por tanto, ambos mecanismos conllevan a la liberación de material directamente en el citosol (Adaptado de Raposo & Stoorvogel, 2013).

De la misma manera que en procariontas, las EVs actúan como lanzadera de diferentes biomoléculas (proteínas, lípidos, hormonas, ácidos nucleicos, etc), permitiendo la transferencia del contenido a otras células, influyendo en su fisiología, y por tanto, realizando una función de comunicación intercelular (Fig. 1.13).

Las EVs son producidas por numerosos tipos celulares y se han aislado directamente de fluidos biológicos, como saliva, orina, aspirado bronquial y nasal, líquido amniótico, leche materna, plasma y suero (Colombo, Raposo, & Théry, 2014; Mateescu et al., 2017).

En la actualidad, el foco de interés reside en el estudio de la encapsulación en las EVs de RNA, principalmente microRNA (miRNA) (Raposo & Stoorvogel, 2013).

### **2.1.1 Los RNA no codificantes de células eucariotas: miRNAs.**

Aunque existe una gran diversidad de RNA no codificantes en las células eucariotas, los más estudiados hasta el momento han sido los microRNAs (miRNAs). Éstos consisten en pequeños transcritos de aproximadamente 22 nucleótidos que regulan la expresión génica tanto en animales, como en plantas o virus. Generalmente, estos ejercen una regulación postranscripcional, induciendo el silenciamiento de genes mediante su unión al mRNA mensajero formando un dúplex mRNA-miRNA, inhibiendo la síntesis proteica o promoviendo su degradación (Graves & Zeng, 2012).

Los miRNAs tienen un papel crucial en el desarrollo de organismos multicelulares participando tanto en la diferenciación como en la proliferación celular. Concretamente se ha observado que cada tipo de célula en diferentes estadios de su proceso de desarrollo presenta un patrón de expresión de miRNAs específico (Bartel, 2004). Además, una alteración de la expresión de miRNAs está asociada a numerosas enfermedades, incluyendo hepatitis, enfermedades cardiovasculares o cáncer (Rupaimoole & Slack, 2017).

Chen y colaboradores (2008) publicaron que tanto el suero como el plasma contenían de forma estable abundantes miRNAs y que estos procedían de diferentes órganos y tejidos. Este interesante descubrimiento abrió la puerta a estudiar el mecanismo por el cual se realizaba la secreción de miRNAs. Paralelamente, se empezó a desarrollar un nuevo campo de investigación basado en sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. Concretamente se ha propuesto que los perfiles de miRNAs circulantes en sangre podrían ser utilizados como biomarcadores para el desarrollo de kits diagnósticos para ciertas enfermedades. Como ejemplo, uno de las líneas de investigación que recibe una mayor financiación es para el desarrollo de kits diagnósticos para cáncer, debido a que presentan la ventaja de que facilitarían el diagnóstico de tumores, evitando la realización de biopsias y promoviendo un diagnóstico temprano, además de facilitar el seguimiento del tratamiento oncológico (Faruq & Vecchione, 2015).



### **2.1.2 Transferencia de miRNAs mediante EVs.**

Valadi y colaboradores (2007) fueron los primeros en describir la secreción de miRNAs en EVs obtenidas tanto de ratón como de una línea de mastocitos humanos. Asimismo, comprobaron que también contenían mRNAs que podían ser transferidos y traducidos a proteínas en la célula receptora. Posteriormente, se han publicado numerosos artículos estudiando los miRNAs encapsulados en EVs, revelando que éstas presentan un perfil de expresión de miRNAs totalmente distinto al de la célula secretora. Todo ello, sugiere la existencia de un mecanismo bien regulado de inclusión de miRNAs en el interior de las EVs (Santangelo et al., 2016; Villarroya-Beltri et al 2014).

Siguiendo en ésta línea, se ha comprobado que estos miRNAs pueden ser transferidos a una célula receptora produciendo un cambio en su expresión celular (Mittelbrunn & Sánchez-Madrid, 2012). Por ejemplo, se ha publicado que las EVs aisladas de pacientes con aterosclerosis en comparación con pacientes sanos presentan unos niveles más elevados de mir-150, cuya diana es c-MYB. El miRNA al ser transferido mediante EVs, inhibe la expresión de c-MYB, promoviendo la migración de células más eficientemente que aquellas EVs aisladas de pacientes sanos (Zhang et al., 2010).

Pero indudablemente, la investigación en cáncer ha sido el campo de la ciencia que más esfuerzos ha dedicado al estudio de los miRNAs encapsulados en EVs (Tkach & Théry, 2016). Todas las células tumorales secretan EVs y éstas contribuyen a la progresión tumoral promoviendo tanto la angiogénesis como la migración tumoral y, por consiguiente, induciendo metástasis. Además se ha comprobado que las EVs también encapsulan moléculas inmunosupresoras que actúan con el fin de atenuar la respuesta inmunológica contra las células malignas y que parte de estas funciones serían realizadas por miRNAs (Kosaka, 2016). Por ejemplo, durante los estadios iniciales en la formación del nicho pre-metastático, es secretado el mir-105 en vesículas induciendo la destrucción de la pared vascular del endotelio, comprometiendo su integridad y facilitando la dispersión tumoral (Zhou et al., 2014).

De la misma manera, se presupone que las EVs presentes en los fluidos biológicos mediarían la transferencia de miRNAs. En un estudio realizado en EVs procedentes de leche materna extraídos durante los 6 primeros meses de lactancia, se detectó una expresión elevada de miRNAs relacionados con la inmunidad (como mir-181 o mir-17), apuntando que las EVs facilitarían la transferencia de miRNAs de madre a hijo con el fin de fortalecer su sistema inmunitario (Yáñez-Mó et al., 2015).

Por otra parte, existen evidencias de que la regulación mediada por miRNAs no sólo se daría entre células de la misma especie, sino que podría modular también procesos de comunicación entre especies lejanas que posiblemente compartan una historia evolutiva. Una prueba de ello es el estudio publicado por Buck y colaboradores (2014), en el que describen que el nematodo gastrointestinal *Heligmosomoides polygyrus* puede secretar activamente miRNAs encapsulados en EVs para suprimir directamente la expresión de genes relacionados con la inflamación y la respuesta inmunológica del huésped, posiblemente favoreciendo su supervivencia. Asimismo, también describieron la presencia de miRNAs circulantes en el torrente sanguíneo de ratones infectados por *Litomosoides sigmodontis*, posiblemente encapsulados también en EVs.

Del mismo modo, miRNAs de origen viral pueden ser transportados a la célula huésped mediante EVs (Yañez-Mo et al., 2015). Por ejemplo, el miRNA mir-BART15 puede ser secretado por EVs de células B infectadas con el virus de Epstein Barr, inhibiendo directamente el componente del inflammasoma NLRP3 en células no infectadas, facilitando la dispersión del virus (Haneklaus et al., 2012). Igualmente, se ha descrito que las células infectadas por HIV, pueden secretar EVs que contienen el miRNA denominado *elemento de respuesta de trans-activación* (TAR), que una vez transferido a células sanas, aumenta la susceptibilidad de las células para ser infectadas por HIV (Narayanan et al., 2013).

Las bacterias gramnegativas también pueden transferir RNAs no codificantes hacia el huésped mediante EVs. El grupo liderado por el Dr. Stanton ha sido el primero en demostrar en *P. aeruginosa* PA14 que un ncRNA particular derivado de un fragmento de tRNA (tRFs), es transferido mediante OMVs a células epiteliales de las vías respiratorias humanas. Produciendo, una disminución en la secreción de IL-8 inducida por la presencia del LPS bacteriano, y por tanto modula la respuesta inmune del huésped (Koeppen et al., 2016).

A modo de conclusión, todas estas evidencias juntas sugieren que los miRNA u otras especies de ncRNA secretados mediante EVs estarían desempeñando un papel importante en la interacción huésped-microorganismo. Sin embargo, no tenemos constancia de que se haya evaluado si los ncRNA de bacterias también estarían mediando procesos de comunicación dentro del contexto de una comunidad bacteriana.

## 2.2 RNAs NO CODIFICANTES EN BACTERIAS.

En general, los organismos contienen en su genoma toda aquella información que les permite desarrollarse en diferentes condiciones y “estilos de vida”. Además, se requieren de sistemas que permitan a los organismos percibir, responder y recuperarse de los cambios que puedan darse en el ambiente. Tradicionalmente, se ha considerado que en bacterias los principales elementos implicados en la modificación de la expresión génica eran los reguladores transcripcionales (*transcriptional factors*, TFs). Éstos actúan mediante modificaciones en la maquinaria de transcripción, recurriendo a diferentes factores sigma que se unen a la RNA polimerasa, reconociendo aquellos promotores que favorecerán la transcripción de genes para la recuperación de la homeostasis bacteriana (Balleza et al., 2009).

En los últimos años, se ha evidenciado la existencia de una regulación a nivel postranscripcional, es decir, una regulación que se activa justo después de que se haya iniciado la transcripción. Dicho de otra manera, se inicia justo en el momento en que empieza la síntesis del mRNA. Este tipo de regulación postranscripcional puede ser ejercida por proteínas de unión al RNA (*RNA-binding proteins*, RBP) o ncRNA (Gottesman et al., 2006; Van Assche et al., 2015).

Los RNA no codificantes de bacterias generalmente se conocen con el nombre de pequeños RNAs (*small RNA*, sRNAs). Fueron descritos casi 40 años atrás, cuando se observó que un transcrito de ~100 nucleótidos, RNA I, bloqueaba la replicación del plásmido ColE1 en *E. coli*, a través de una unión complementaria que conducía a la linealización del plásmido. Recientemente, gracias al desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva que han permitido el análisis completo de genomas bacterianos, se ha revelado la extensa producción de pequeños transcritos con un tamaño comprendido entre 50-500 nucleótidos. Éstos suelen localizarse en regiones intergénicas de zonas codificantes para proteínas (Waters & Storz, 2009).

Los sRNAs están involucrados en diferentes procesos biológicos como la reprogramación de la transcripción, metabolismo del carbono, control de la homeostasis de hierro, mantenimiento de la envuelta celular, formación de biofilms o patogenicidad y virulencia bacteriana (Repoila & Darfeuille, 2009). Una característica particular de los sRNAs es que normalmente presentan una elevada variabilidad de secuencias y tan solo existe cierta homología entre especies estrechamente relacionadas (Livny & Waldor, 2007). Por ejemplo, el sRNA denominado PrrF1/PrrF2 en *P. aeruginosa* no mantiene ningún

parecido a nivel de secuencia con RyhB de *E. coli*, aunque ambos sRNA actúan sobre dianas parecidas, controlando los niveles de hierro del organismo y están reprimidos por la proteína reguladora Fur (Richards & Vanderpool, 2011).

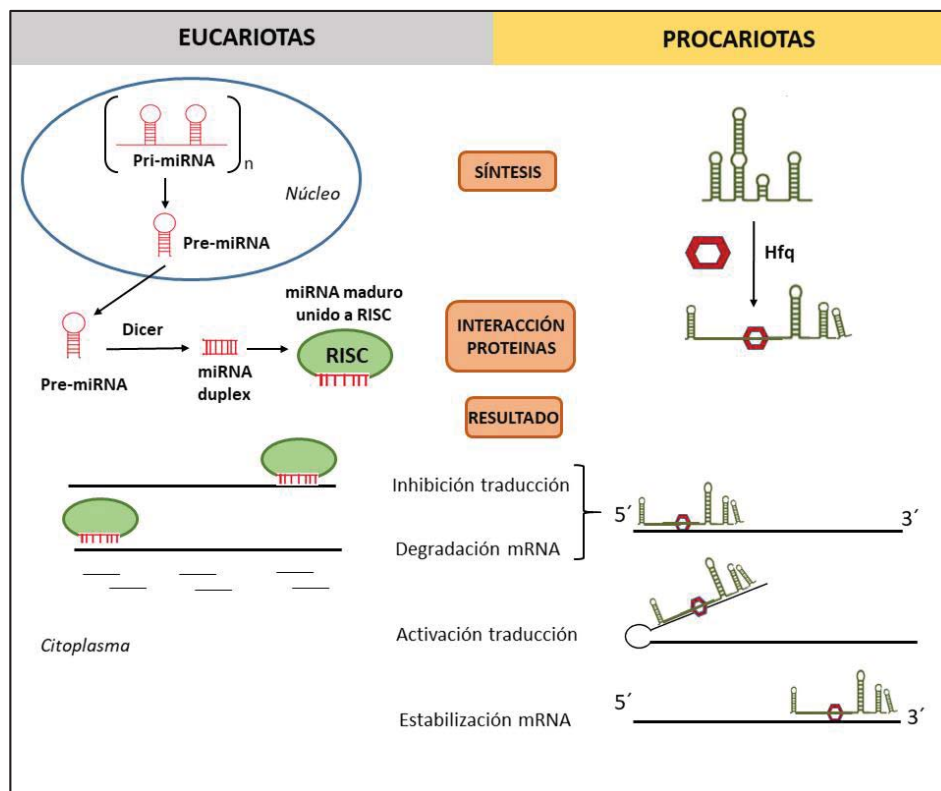
### 2.2.1 Tipos de sRNA en bacterias.

Los sRNAs bacterianos se pueden dividir en diferentes clases en función de su mecanismo de acción. Los **riboswitches** que consisten en secuencias de RNA, generalmente localizadas en el extremo 5' del mRNA y que no se traducen en proteínas (*5' untranslated regions*, UTRs). Éstos regulan la traducción del mRNA adyacente mediante la adopción de diferentes conformaciones, que son adoptadas como respuesta a cambios en la temperatura o la presencia de metabolitos (Breaker, 2012). Otro grupo de sRNAs recientemente descrito, son los que se conocen con el nombre de **CRISPRs** (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). Éstos están formados por secuencias cortas y repetidas, que se alternan con zonas altamente variables denominadas “secuencias espaciadoras” que son homologas a secuencias de DNA foráneo procedente de bacteriófagos o plásmidos. Funcionalmente, las secuencias CRISPRs configuran el sistema inmunitario adaptativo de las bacterias, ya que mediante la introducción de secuencias de DNA exógeno en su genoma, previene la “re-infección” de la célula degradando el material genético foráneo (Bhaya et al., 2011).

Por otra parte, hay sRNAs que operan mediante la **unión a proteínas reguladoras** centrales, secuestrándolas y antagonizando los efectos de dichas proteínas. Curiosamente, los ejemplos mejor caracterizados, son aquellos sRNAs que ejercen la regulación postranscripcional mediante la unión a proteínas reguladoras tipo *RNA-binding proteins* (RBP). Generalmente, éstas se encuentran bloqueando el sitio de unión al ribosoma (*Ribosome binding site*, RBS) impidiendo su traducción a proteína. Por lo tanto, el sRNA secuestrará la proteína reguladora, lo que permitirá la liberación del RBS y el inicio de la traducción. Un ejemplo es el caso de la regulación ejercida por RsmY y RsmZ en *P. aeruginosa*, que se unen a RsmA, activando la traducción de aquellos transcritos implicados en la formación de biofilm (Repoila & Darfeuille, 2009).

El grupo mejor caracterizado son los sRNA **antisentido**, cuya secuencia es complementaria a una región de mRNA. Por lo tanto, ejercen su función mediante una unión antisentido al mRNA diana que puede dar lugar a una activación o inhibición de la traducción, así como a incrementar la estabilidad del mRNA. Según la localización en el genoma del sRNA respecto a su mRNA diana, éstos pueden ser subdivididos en dos

clases. Los sRNA **codificados en cis** (*cis-encoded*) que están localizados en la fibra de DNA directamente opuesta a su diana de mRNA. Éstos presentan una elevada complementariedad y generalmente conllevan a una regulación negativa. Mientras que los sRNA **codificados en trans** (*trans-encoded*), pueden ejercer sobre su mRNA diana tanto una función positiva (facilitando la traducción) como negativa (degradación del mRNA, inhibición de la traducción o terminación de la transcripción). Esta clase de sRNA antisentido en *trans* se caracteriza por estar codificados en regiones lejanas del mRNA diana y su grado de complementariedad es menor, por lo que suelen requerir la ayuda de proteínas que faciliten y establezcan la interacción del mRNA-sRNA, como es el caso de la chaperona Hfq (Richards & Vanderpool, 2011).



**Figura 1.14. Esquema ilustrativo comparando la síntesis y el mecanismo molecular entre los ncRNAs presentes en eucariotas (miRNA) y procariotas (sRNA).** En eucariotas se muestra el mecanismo simplificado de biogénesis más frecuente de miRNAs (izquierda). Un largo transcrito primario (pri-miRNA) es sintetizado en el núcleo y posteriormente es procesado en pequeños pre-miRNA (~60 nt) con la clásica estructura de “horquilla”. Éstos son transportados al citoplasma y son procesados mediante la RNase III denominada DICER en pequeños dúplices de miRNA (~22 nt). Posteriormente, se produce la separación de las hebras que se unen al complejo RISC (*RNA-induced silencing complexes*) para producir la degradación del mRNA o la inhibición de la síntesis proteica. En cambio, en procariotas los sRNAs son producidos como un solo transcrito (50-500 nt), con una estructura secundaria compleja. Sin ningún tipo de procesamiento, estos se unen a

Hfq que produce un cambio conformacional, permitiendo su unión al mRNA. Como resultado, pueden estimular o inhibir la síntesis proteica, promover la degradación del mRNA o aumentar su estabilidad del mRNA. (Esquema adaptado de Gottesman, 2005).

### 2.2.2 Ventajas de la regulación mediada por sRNA.

La regulación ejercida por sRNA presenta ciertas ventajas respecto a la realizada por TFs. La primera es que los sRNA al tratarse de transcritos de pequeño tamaño (~ 100 nt) se sintetizan más rápidamente y con un coste menor para la célula, en comparación con la síntesis de una proteína *de novo*. A modo de ejemplo, el tamaño medio de una proteína de *E. coli* es de 350 aminoácidos por lo tanto, implica la síntesis de un transcrito de unos ~1000 nt y su posterior traducción. Otra ventaja que presenta la regulación ejercida por sRNAs es que no requieren del paso de ser traducidos a proteínas al ser funcionales por ellos mismos.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que los sRNAs actúan de forma estequiométrica con su mRNA diana. Es decir, una molécula de sRNA se une a una molécula de mRNA (la unión es 1:1), como consecuencia, la concentración de cada elemento es crítica para observar un efecto. Por ejemplo, en aquellos sRNA que actúan negativamente degradando un mRNA, si la  $[sRNA] \gg [mRNA]$  la expresión del mRNA está completamente silenciada, mientras que si la  $[sRNA] \ll [mRNA]$ , el efecto del sRNA es prácticamente imperceptible. Este efecto umbral de la represión del sRNA sugiere que éstos no son tan efectivos para generar una respuesta bajo señales cortas o poco intensas, aunque se piensa que esta regulación sería extremadamente sensible cuanto más próxima esté del umbral de activación (Waters & Storz, 2009).

Además, los sRNAs al actuar a nivel postranscripcional actuarían sobre una diana que ya está sintetizada (mRNA) y presente en el citoplasma bacteriano, a diferencia de los reguladores TF que actúan a nivel de promotor. En un escenario en que se produce un cambio brusco en el entorno de la bacteria, los sRNAs permiten a la célula adaptarse rápidamente parando la síntesis proteica degradando ciertos mRNAs, o por lo contrario, pueden promover la traducción de aquellos mRNAs que se encuentran “inactivos” en el citoplasma bacteriano. En consecuencia, permite ajustar la fisiología bacteriana de una manera extremadamente rápida gracias a su regulación de mensajes “preexistentes” (Massé & Gottesman, 2002).

En conclusión, se ha propuesto que la modificación de la expresión génica ejercida por sRNAs podría ser más rápida que la realizada por factores de transcripción y ejercerían

una regulación “fina” del metabolismo de la bacteria ajustándolo a un ambiente cambiante (Legewie et al., 2008; Levine et al., 2007; Mehta et al., 2008; Shimoni et al., 2007).

### **2.3 LA BACTERIA DE ESTUDIO: *Pseudomonas aeruginosa*.**

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gramnegativa, de origen ambiental, capaz de habitar en una gran diversidad de nichos ecológicos debido a su versatilidad metabólica. Puede sobrevivir empleando una gran variedad de fuentes de carbono, utilizar nitrógeno como aceptor terminal de electrones para respirar en condiciones anaeróbicas, crecer en un rango amplio de temperaturas y para su desarrollo, requiere de un mínimo de nutrientes (Kung et al., 2010). Además, presenta una elevada persistencia gracias a su habilidad de formar biofilms y dispone de diferentes sistemas de secreción que le permiten eliminar microorganismos depredadores, bacterias competidoras o células del sistema inmunológico (Moradali et al., 2017).

Por otra parte, *P. aeruginosa* es un importante patógeno oportunista resistente a diferentes antibióticos y responsable de numerosas infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos. Éstas infecciones suelen afectar ojos, quemaduras, tracto urinario, corazón, tracto respiratorio etc. Pero son especialmente graves y muy frecuentes en pacientes con fibrosis quística (FC). Además, es el agente etiológico de numerosas infecciones hospitalarias asociadas al uso de dispositivos médicos como catéteres o ventiladores mecánicos (Gellatly & Hancock, 2013).

Curiosamente y con muy pocas excepciones, se ha observado que los aislamientos clínicos procedentes de infecciones agudas o crónicas, son prácticamente indistinguibles de los aislados ambientales. Ello sugiere que las mismas capacidades que permiten a *P. aeruginosa* vivir en el medio ambiente, también son las responsables de su patogenicidad y virulencia (Valentini et al., 2018). Por lo tanto, en los siguientes apartados introduciremos el ciclo de vida de *P. aeruginosa* y su relación con la formación de biofilm y su patogenicidad. Para finalizar, introduciremos aquellos sRNAs que están involucrados de alguna manera en el desarrollo del biofilm bacteriano en *Pseudomonas aeruginosa*.

#### **2.3.1 El “ciclo de vida” de *Pseudomonas aeruginosa*.**

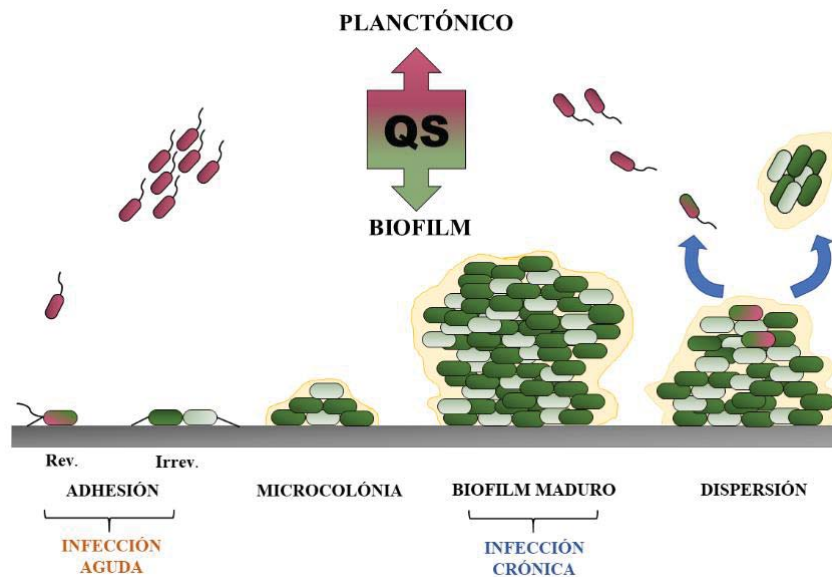
Generalmente, *P. aeruginosa* se encuentra en el ambiente formando biofilms, que se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz y adheridos a una superficie, ya sea inerte o a un tejido vivo. Esta matriz está formada principalmente por agua y exopolisacárido (EPS), aunque en menor medida encontramos

también proteínas secretadas al medio, DNA extracelular, OMVs y restos celulares generados durante la lisis bacteriana. Estudios realizados para caracterizar la estructura interna del biofilm, han observado la existencia de canales que permiten el flujo de agua, oxígeno y nutrientes hacia el interior y viceversa, permitiendo el establecimiento de un gradiente químico de sustancias y nutrientes a lo largo del biofilm, que promueve el desarrollo de diferentes fenotipos y genotipos bacterianos dentro de la misma comunidad (Stewart & Franklin, 2008).

El establecimiento del biofilm supone un elevado coste energético por lo tanto, ha de conferir ciertos beneficios ecológicos y fisiológicos a la bacterias que lo conforman. En primer lugar, se ha propuesto que el biofilm actúa como una barrera física que separa la comunidad bacteriana de su ambiente, protegiéndola por ejemplo de las defensas del huésped durante una infección, o bien evita la presencia de protozoos depredadores. Asimismo, este efecto de barrera también le otorga cierta tolerancia frente sustancias dañinas que puedan estar en el medio, ya sean antibióticos o desinfectantes. Además, también reducen la difusión de elementos solubles de la respuesta inmune del huésped.

La matriz del biofilm al estar formada principalmente por agua, protege a las células de la desecación y confiere un microambiente estable para el desarrollo de la comunidad facilitando su interacción y promoviendo el intercambio entre células. Por lo tanto, no es sorprendente que en la mayoría de los casos las bacterias se encuentren en el ambiente formando biofilms en vez de estar en forma de vida libre o planctónica (Hall-Stoodley et al., 2004).





**Figura 1.15.** Esquema del ciclo de vida de *P. aeruginosa* y su relación con la patogenicidad y formación de biofilm (Adaptación de Valentini et al., 2018).

El desarrollo del biofilm puede ser dividido al menos en 4 estadios (Fig. 1.15): la adhesión (reversible y después irreversible), formación del biofilm temprano (microcolonia), desarrollo del biofilm maduro y por último, la dispersión. En esta última fase en la que hay escasez de nutrientes, bacterias aisladas pueden desprenderse volviendo al estado planctónico, con el fin de colonizar nuevos ambientes y establecer una nueva comunidad bacteriana (Chua et al., 2014). Otro posible escenario, es que se desprenda un trozo de biofilm que se adherirá entero a otra superficie generando una nueva comunidad pero, partiendo esta vez del estadio de microcolonia (Irie et al., 2016).

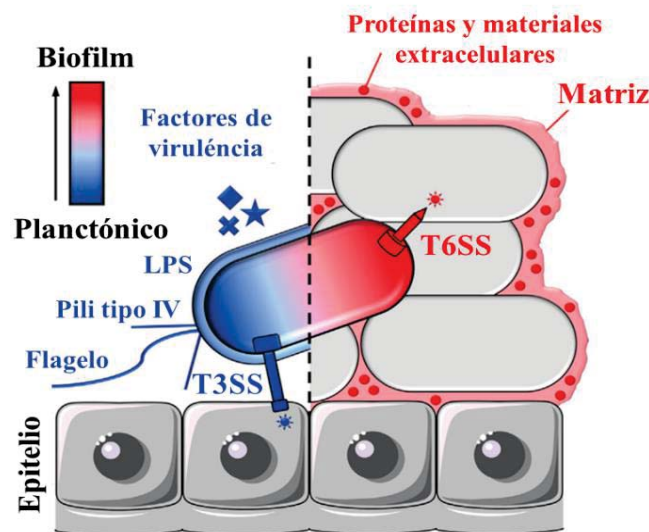
Los diferentes estadios del ciclo del desarrollo del biofilm, están coordinados gracias a la secreción de señales moleculares al medio extracelular que conforman el sistema de *Quorum Sensing* (QS) de *Pseudomonas aeruginosa* (Stoodley et al., 2002).

### 2.3.2 Patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa* asociada al ciclo de vida.

Como hemos explicado anteriormente, los aislamientos ambientales de *P. aeruginosa*, no se distinguen prácticamente de aquellos que han sido aislados en ambientes hospitalarios. Ello indica, que las mismas habilidades que permiten a la bacteria vivir en la “naturaleza”, también son las responsables de su patogenicidad y virulencia. Por lo tanto, la patogenicidad de la bacteria está íntimamente ligada su ciclo de vida, es decir, a su

capacidad de colonizar distintos nichos ecológicos y desarrollar un biofilm (Moradali et al., 2017).

Durante el desarrollo del biofilm bacteriano, la bacteria presenta una expresión génica completamente diferente en cada una de las fases (Fig. 1.15). En la etapa inicial, la bacteria necesita adherirse a una superficie y establecerse en consecuencia, éstas presentan un fenotipo altamente invasivo, en el que las bacterias se dividen muy rápidamente y expresan todo aquel arsenal de moléculas que le permitirán colonizar un nuevo nicho (Fig. 1.16, azul). Este fenotipo desarrollado en la fase de adhesión y microcolonia, coincide con el observado en procesos de **infección aguda**. En esta etapa, las células exhiben todo un arsenal de factores de virulencia; secretan proteasas y toxinas directamente al medio a través del sistema de secreción T2SS, expresan el Pili tipo IV y flagelos. Además de expresar el sistema de secreción T3SS que permite la inyección de compuestos tóxicos directamente en la célula eucariota (Fig. 1.16, azul).



**Figura 1.16.** Esquema ilustrativo que muestra los factores de virulencia según la fase de crecimiento en que se encuentra *P. aeruginosa*. Fenotipo infección aguda (azul) vs fenotipo infección crónica (rojo). (Esquema adaptado de Valentini et al., 2008)

Los factores de virulencia que son importantes para el establecimiento de infecciones agudas no son los mismos empleados para el establecimiento de una **infección crónica**. En este escenario *P. aeruginosa* es mínimamente invasiva y citotóxica (Fig. 1.16, rojo). Este tipo de infección implica la formación de biofilms que, en el contexto de una

infección en humanos, protege contra el ataque del sistema inmune del huésped y de la acción de antibióticos, favoreciendo la persistencia de la bacteria. En la fase de biofilm maduro se expresan aquellos enzimas implicados en la producción de distintos EPS (síntesis del alginato y ramnolípidos) y se promueve la secreción de productos beneficiosos para la comunidad. A modo de ejemplo, en este estadio se liberan al medio sustancias que favorecerán la disponibilidad de nutrientes como sideróforos que permitirán la captación de hierro o enzimas degradativos como proteasas o elastasas. Estos enzimas también ejercerán una función de protección de la comunidad bacteriana al degradar elementos de la respuesta inmunitaria del huésped. También en esta fase se expresa el complejo de secreción T6SS que permite la inyección de sustancias tóxicas directamente en el citoplasma bacteriano, eliminando las bacterias del entorno (Coggan & Wolfgang, 2012; Valentini et al., 2018).

### **2.3.3 Quorum sensing en *Pseudomonas aeruginosa*.**

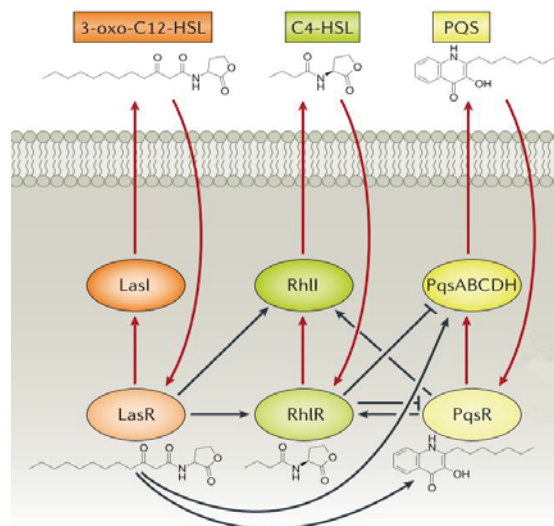
Durante las 2 últimas décadas se han dedicado grandes esfuerzos a entender el mecanismo por el que sucede la comunicación bacteriana, ya que regula el proceso de formación y mantenimiento del biofilm y por lo tanto, está directamente implicado en el desarrollo de las infecciones agudas y crónicas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Se denomina “*Quorum sensing*” (QS) al proceso de comunicación célula-célula, que permite a la bacteria modificar colectivamente su comportamiento como respuesta a cambios en la densidad celular o en el ambiente de la comunidad microbiana, con el fin de conseguir un resultado que sería totalmente imposible de alcanzar para una célula individual (Camilli & Bassler, 2006; Lee J. & Zhang, 2014). El QS implica la producción, secreción, detección, integración y la respuesta grupal a una gran variedad de moléculas señalizadoras extracelulares denominadas autoinductores (AI). Estos autoinductores se acumulan en el ambiente a medida que la densidad bacteriana aumenta, y las bacterias son capaces de monitorizar los cambios en la concentración de éstos autoinductores con el fin de alterar colectivamente la expresión génica de la comunidad bacteriana. Algunos de los procesos controlados por el QS son la bioluminiscencia, la secreción de factores de virulencia, la producción de sustancias beneficiosas o la formación de biofilms (Papenfort & Bassler, 2016).

*Pseudomonas aeruginosa* presenta una de las redes de señalización más complejas y mejor estudiadas. Normalmente se considera que está compuesta por tres sistemas: *las*, *rhl* y *pqs* (Fig. 1.17). Los sistemas *las* y *rhl* están integrados por dos acilhomoserina

lactona sintasas, LasI y RhII, que generan las señales N-3-oxo-dodecanoil homoserina lactona (3OC12HSL) y N-butanoil-homoserina lactona (C4HSL), respectivamente. Estas señales tipo homoserina lactona (AHL) se van secretando al medio a medida que la población bacteriana crece, interactuando con los receptores LasR y RhIR, generando una modulación de la expresión génica una vez alcanzada la concentración umbral de activación.

Paralelamente, El sistema *pqs* usa las señales de 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) y 2-heptil-4-hidroxi-quinolona (HHQ) y como receptor de la señal PQS emplea el regulador transcripcional, PqsR (también conocido como MvfR). Los tres sistemas QS están interconectados con *las* en la parte superior de la cascada de QS, que controla a su vez la expresión de los sistemas *rhl* y *pqs* (Coggan & Wolfgang, 2012; Lee J. & Zhang, 2014).



**Figura 1.17. Esquema ilustrativo en el que se muestran las vías de QS más estudiadas en *P. aeruginosa*.** Las líneas negras muestran como las diferentes vías están interrelacionadas a distintos niveles. Además, es importante destacar que las señales QS presentan un efecto de retroalimentación, amplificando su efecto con el fin de conseguir un comportamiento sincrónico en la comunidad (líneas rojas) (Papenfort & Bassler, 2016).

*Pseudomonas aeruginosa* dispone de otras señales moleculares que también mediarían la comunicación y por tanto participarían del sistema de QS. Entre ellas, encontramos

diferentes pigmentos como la pioverdina y piocianina que son producidas generalmente en la fase estacionaria, también se secretan ácidos grasos de cadena corta como el 2-cis-decenoico y que estarían involucrados en la comunicación entre bacteria-planta, o la molécula que antagonizaría la acción de los autoinductores tipo AHL, denominada diketopiperazina (DKPs) (Jimenez et al., 2012).

Una vez que las señales extracelulares son captadas o interpretadas por la célula receptora, éstas necesitan ser transducidas al interior de la célula para poder generar un cambio en la expresión génica. Generalmente, esto se realiza mediante la alteración de los niveles intracelulares de mensajeros secundarios, como son el 3',5'-diguanylate cíclico (c-di-GMP) o la adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (Coggan & Wolfgang, 2012; Jimenez et al., 2012).

Por último, existiría otro sistema QS en *P. aeruginosa*, pero se desconocen las señales extracelulares que conducen a su activación y por lo tanto no está incluido en la Fig. 1.16. Sin embargo, regula la transición entre el estado planctónico a biofilm. Se trata del sistema Gac/Rsm, que contrariamente al sistema QS, controla la expresión de los factores de virulencia a nivel postranscripcional, mediante la alteración de la estabilidad de los mRNA gracias a la acción de tres sRNA (RsmZ, RsmY, RsmW), ejerciendo una modulación rápida y sensible de la expresión celular (Jimenez et al., 2012):

#### **2.3.4 sRNA y la formación de biofilms en *Pseudomonas aeruginosa*.**

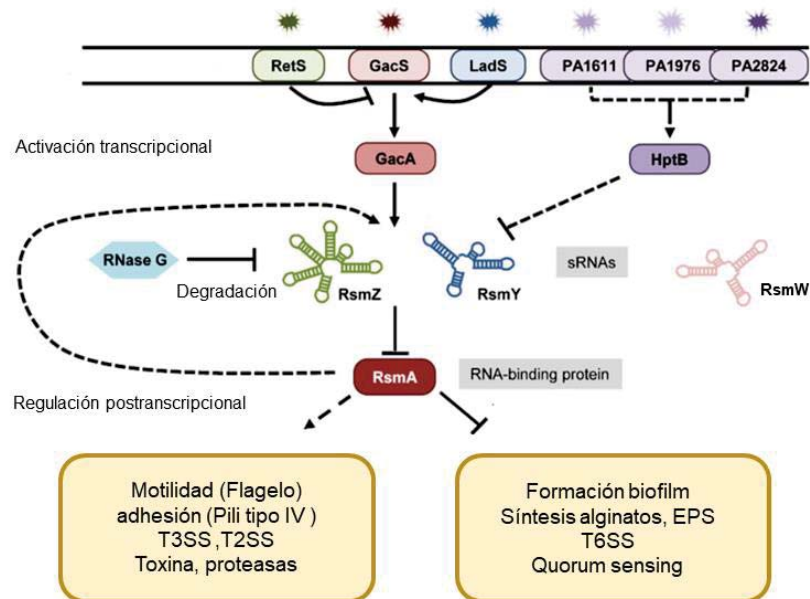
En *P. aeruginosa* se han realizado diferentes estudios transcriptómicos rebelando cerca de 200 posibles candidatos a sRNA. Estos se han llevado a cabo en cepas cultivadas en diferentes condiciones de temperatura, estrés osmótico u oxidativo, presencia de antibióticos y diferentes fases de crecimiento (Gómez-Lozano, et al, 2012, 2014). Pero a pesar del gran número de candidatos, los sRNAs descritos funcionalmente en *P. aeruginosa* son limitados. Mayoritariamente, están implicados en procesos metabólicos como la regulación de la homeostasis del hierro (PrrF1/2, PrrH), metabolismo del nitrógeno (NrsZ, PaiI), formación de síntesis de alginatos (ErsA) o la tolerancia al estrés oxidativo ejercido por peróxido de hidrogeno (RgsA) (Ferrara et al., 2015; Sonnleitner & Haas, 2011; Tata et al., 2017; Wenner et al., 2014; Wilderman et al., 2004).

A continuación, se explica con detalle el mecanismo molecular de aquellos sRNAs de *P. aeruginosa* empleados en la presente tesis doctoral y que de algun modo, están involucrados en el establecimiento o mantenimiento del biofilm.

### 2.3.4.1 sRNAs involucrados en la transición a biofilm: *RsmX/Y/Z*.

Tal como hemos introducido anteriormente, los sRNA *RsmZ* y *RsmY* forman parte del sistema de señalización intracelular *Gac/Rsm*, involucrado en la transición entre el estado de vida planctónico a biofilm, o en entre la fase de infección aguda y crónica (Fig. 1.18). Al mismo tiempo, en este sistema participan el sistema de transducción de dos componentes *GAC* (*GacS/GacA*) y la proteína reguladora postranscripcional *RsmA*.

El sistema *GAC* es un sistema de transducción de señal que está constituido por una proteína de transmembrana sensora tipo quinasa, *GacS*, que se autofosforila en respuesta a un estímulo, y transfiere el grupo fosfato a la proteína reguladora de respuesta, *GacA*. Esta proteína una vez activada inducirá la expresión de dos sRNAs, *RsmZ* y *RsmY*, que se unirán a la proteína *RsmA*, liberando la región de unión del ribosoma (RBS) y por tanto, promoviendo la traducción de mRNAs (Kay et al., 2006).



**Figura 1.18. Modelo del sistema *Gac/Rsm* en *Pseudomonas aeruginosa*.** La transcripción de *rsmZ/Y/W* es activada por el sistema de dos componentes *GAC*, que está bajo el control de tres quinazas sensoras (*RetS*, *GacS*, *LadS*). *RsmX/Y/W* antagonizan la acción de *RsmA*, mediante su secuestro. La expresión de los sRNAs además, está sujeta al control de elementos reguladores adicionales. Información ampliada se encuentra en el texto (Sonnleitner & Haas, 2011).

Mediante su unión al RBS, RsmA reprime aquellos mRNAs necesarios para el establecimiento de una infección crónica, como son sistema de secreción T6SS, la producción de EPS, formación de biofilm, síntesis de sideróforos, ramnolípidos o HCN. Al mismo tiempo, promueve aquellas características que le permitirán establecer una infección aguda asociada generalmente al fenotipo planctónico. Por lo tanto, promueve la motilidad y adhesión a la superficie mediante la producción de flagelos, pilis, sistemas de secreción tipo T3SS y T4SS. Además, encontramos una modulación intracelular de los niveles de di-nucleótidos tipo c-di-GMP y de la actividad del sistema Vfr (*cAMP/virulence factor regulator (Vfr) route*) que regula la ruta sintética de varios factores de virulencia (Coggan & Wolfgang, 2012; Valentini et al., 2018).

Además, la activación de GacA está regulada por otras dos proteínas sensoras situadas en la membrana: LadS ejerciendo una regulación positiva, mientras que RetS la inhibe. A pesar de que este sistema es uno de los más estudiados en *P. aeruginosa*, se desconoce totalmente que señales extracelulares producen la activación de dichas quinasas sensoras. Sin embargo, se ha propuesto que los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos o la temperatura podrían influir en su activación (Miller et al., 2016; Sonnleitner & Haas, 2011)<sup>1</sup>.

Algo realmente curioso, es que los dos sRNAs, a pesar de que realizan una función redundante y ambos son activados mediante GacA, difieren en su expresión temporal y su estabilidad, suscitando una modulación exquisita de la fisiología de la bacteria (Miller et al., 2016). En *P. aeruginosa*, la transcripción de *rsmY* es paralela al crecimiento bacteriano, mientras que *rsmZ* es producido masivamente durante la transición entre la fase estacionaria tardía a estacionaria. Sin embargo, después de 24 horas los transcritos de RsmZ son degradados, con el fin de permitir la formación del biofilm y su eliminación está bajo el control del sistema de dos componentes BfiSR activando la ribonucleasa G (Fig. 1.18). Mientras que RsmY, se encuentra estabilizado mediante su unión a la chaperona Hfq incrementando su vida media en el interior de la célula. Además, se ha descubierto que la expresión de *rsmY* está inhibida por otro sistema de dos componentes formado por la proteína HptB y que está es bajo el control de tres quinasas sensoras (PA1611, PA1976, PA2824) y no tiene ninguna influencia sobre RsmZ. Por lo tanto,

---

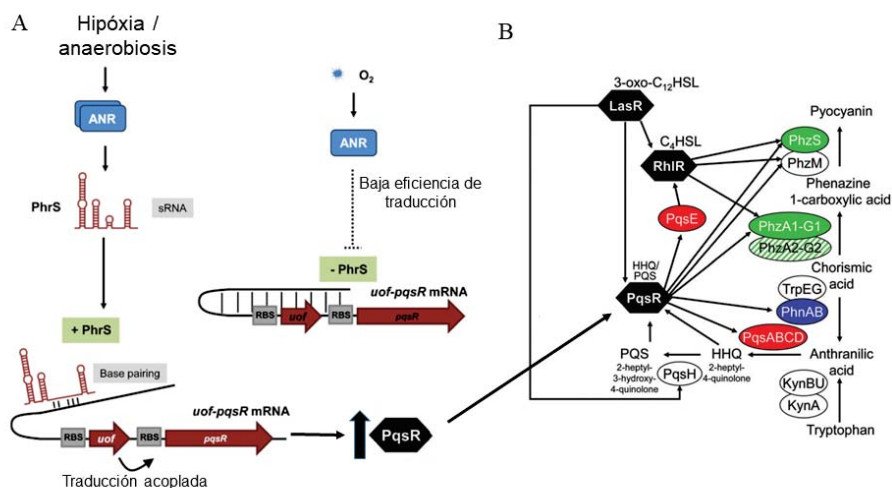
<sup>1</sup> En este punto, se recomienda la consulta del artículo *Global regulatory pathways and cross-talk control Pseudomonas aeruginosa environmental lifestyle and virulence phenotype* (2012) escrito por Coggan & Wolfgang. Principalmente, porque aporta un esquema ilustrativo que facilitará la comprensión de la compleja red de señales intracelulares que participan en la transición entre el estado planctónico-biofilm y como están interrelacionadas.

RsmY y RsmZ a pesar de ser redundantes tienen una regulación totalmente independiente (Sonnleitner & Haas, 2011). Por último, se ha descrito un nuevo sRNA, denominado RsmW, que también operaría sobre RsmA pero que a diferencia de los otros dos, su expresión no está regulada por GacA, (Miller et al., 2016).

#### 2.3.4.2 sRNA involucrado en la síntesis de PQS en condiciones de hipoxia: PhrS.

*P. aeruginosa* obtiene la energía preferentemente de la respiración aeróbica, aunque también puede adaptarse a situaciones en que las concentraciones de oxígeno son extremadamente bajas (hipoxia). El activador transcripcional ANR, promueve la síntesis de una vasta red de genes que permitirán la adaptación de la fisiología a condiciones de anaerobiosis o de hipoxia. Concretamente, induce la síntesis de la vía de la arginina deiminasa con el fin de obtener ATP y la activación de la vía de la desnitrificación, que permitirá la utilización del nitrato o nitrito como aceptores finales de electrones.

Por lo tanto, ANR se activa en situaciones donde hay una elevada densidad bacteriana que comporta la disminución de oxígeno. En este escenario también ANR promueve la expresión de un sRNA denominado PhrS. Éste, mediante la unión a la región 5'UTR del mRNA que codifica para el regulador PqsR, estimula la ruta sintética de PQS, la secreción de pirocianina, la síntesis de factores de virulencia y la formación de biofilm (Fig. 1.19). (Sonnleitner et al., 2011b).





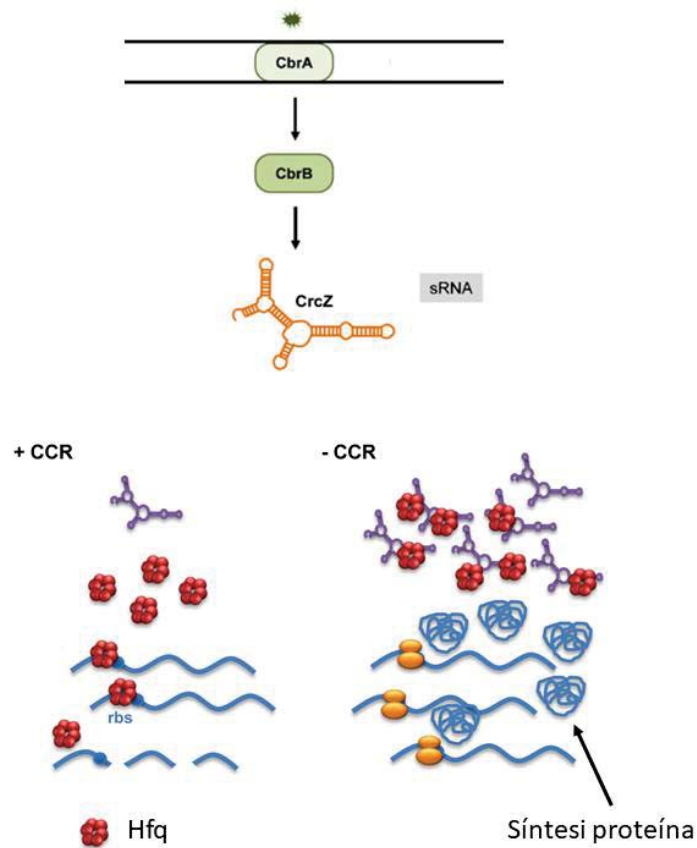
**Figura 1.19. Modelo actual de la regulación de PqsR mediante PhrS en condiciones limitantes de oxígeno en *Pseudomonas aeruginosa*.** (A) La transcripción de PhrS requiere la proteína ANR, que se activa en presencia de una baja concentración de O<sub>2</sub>. En ausencia de PhrS, *pqsR* se traduce con muy baja eficiencia, debido a que una estructura intramolecular impide la unión del ribosoma. Cuando se expresa PhrS, éste se une a la región 5'UTR del mRNA de *pqsR*, modificando la estructura secundaria y activando la traducción de un pequeño ORF (uof) localizado *upstream* de *pqsR*. La traducción de ambos está acoplada, induciendo la traducción de PqsR, que induce la síntesis de PQS y piocianina. (B) Esquema global que ilustra la regulación de la síntesis de PQS y piocianina mediada por PhrS y PqsR. La transcripción del regulador PqsR está controlado por LasR, que se activa por la señal de QS tipo AHL (3-oxo-C12-HSL). PqsR activa la transcripción del operón *phzAI-GI* y por *phzS* y *phzM*, involucrados en la síntesis de piocianina. Simultáneamente, regula la transcripción de los genes *phnAB* (que codifican para una antranilato sintasa) y *pqsABCDE*, ambos necesarios para la síntesis de PQS (Sonnleitner et al., 2011; Sonnleitner & Haas, 2011).

#### 2.3.4.3 sRNA involucrado en el control metabolismo carbono: CrcZ.

*Pseudomonas aeruginosa* es un organismo metabólicamente versátil, que tiene la habilidad de utilizar diferentes fuentes de carbono, que permiten a la bacteria adaptarse a diferentes nichos ecológicos. En bacterias, la utilización de diferentes fuentes de carbono está controlada jerárquicamente por el mecanismo de represión del catabolismo del carbono (*carbon catabolite repression*, CCR). En *P. aeruginosa* parece ser que el control de la CCR se realiza a nivel postranscripcional, siendo la chaperona Hfq uno de los principales reguladores identificados hasta la actualidad (Sonnleitner & Bläsi, 2014).

Hfq, es una proteína de unión al RNA presente en diferentes géneros bacterianos y se ha observado que es una pieza clave para el desarrollo de la virulencia y fisiología bacteriana (Van Assche et al., 2015). Esta proteína tipo chaperona opera a nivel postranscripcional, facilitando la interacción del sRNA con el mRNA diana, permitiendo la formación del dúplex mRNA-sRNA (ver Fig. 1.14). Hfq se une a un elevado número de sRNAs, ejerciendo un efecto pleiotrópico en el organismo. Concretamente, estudios transcriptómicos han descrito que la delección de *hfq* en *P. aeruginosa* conlleva a la afectación de aproximadamente el 5% del total de transcritos de la célula (Sonnleitner et al., 2003, 2008).

En cuánto al papel que desempeña en la CCR, Hfq en presencia de una fuente carbono preferente (p. ej. succinato) se encuentra unida al RBS de mRNAs que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo de fuentes de carbono no preferentes (p.ej. glucosa, manitol). Por lo tanto, Hfq opera como represor traduccional de transcritos sujetos a una regulación de CCR (Fig. 1.20).



**Figura 1.20. Modelo de represión del catabolismo del carbono (CCR), controlado por el sistema de dos componentes CbrA/CbrB.** Éste es activado mediante una señal extracelular, que inducirá la transcripción de *crcZ*. En ausencia de CrcZ, la chaperona Hfq se encuentra unida al RBS del mRNA, impidiendo su traducción. En condiciones donde la fuente de carbono preferente no está disponible, el sistema CCR se activa y CrcZ secuestra Hfq, liberando el RBS y activando la traducción de proteínas involucradas en el metabolismo de fuentes de carbono no preferentes, como la acetamida o manitol (Sonnleitner et al., 2011, 2014).

En aquellas situaciones en las que no está disponible una fuente de carbono preferente se sintetiza un sRNAs denominado CrcZ y que presenta una elevada afinidad por Hfq. Así pues, un incremento en CrcZ conlleva el secuestro de Hfq, liberando el RBS de los mRNA que sintetizan para proteínas encargadas del metabolismo de fuentes de carbono no preferentes, induciendo una relajación de la represión del catabolismo del carbono y la adaptación de la fisiología de *P. aeruginosa* (Fig. 1.20). La expresión de CrcZ, está regulada a través del sistema de dos componentes CbrA/CbrB, que se encarga de mantener el equilibrio de la ratio carbono-nitrógeno y es el responsable de detectar las fuentes de carbono disponibles en el ambiente (Sonnleitner et al., 2009).

En cuanto a su relación con la regulación del biofilm, se ha observado que Hfq se une a un elevado número de mRNAs implicados en la formación de biofilms y el QS bacteriano. Además, se ha observado que en los biofilms obtenidos en condiciones anaeróbicas las células presentan una mayor expresión de *crcZ* y un mutante delecionado en *crcZ* muestra una mayor capacidad de formación de biofilm en condiciones anóxicas, mientras que una sobreexpresión de *crcZ* limita el desarrollo de la comunidad bacteriana. En este escenario, los autores sugieren que CrcZ no estaría ejerciendo una regulación en el catabolismo del carbono, sino que su efecto regulatorio principal sería limitar la formación de biofilm mediante el secuestro de Hfq (Pusic et al., 2016).

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Los estudios de la composición de las OMVs secretadas por numerosas bacterias gramnegativas, detectan repetidamente la presencia de proteínas procedentes de membrana interna (IM) y del citoplasma. Además, en los análisis proteómicos realizados por nuestro grupo en cepas procedentes de muestras ambientales de la Antártida, confirman este hecho. Asimismo, el estudio de la estructura de la cepa Antártica *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>, reveló la presencia de un tipo de vesícula más compleja, con una doble bicapa lipídica y que encapsulaba en su interior contenido de elevada densidad electrónica, similar al contenido del citoplasma. Este hecho, sugeriría un mecanismo de formación distinto a los propuestos y un nuevo tipo de vesículas de membrana externa.

Así pues, el objetivo principal del primer apartado es la caracterización estructural de un nuevo tipo de vesícula de membrana en bacterias gramnegativas, que permitiría explicar la secreción de material procedente del citoplasma. Esta caracterización estructural se llevará a cabo mediante el uso de diferentes técnicas de microscopía, que compartan la característica común que la muestra es fijada mediante una congelación extremadamente rápida, permitiendo parar todos los procesos fisiológicos al instante, además de, respetar al máximo la estructura nativa de la célula, evitando la presencia de artefactos.

Nuestra hipótesis plantea que:

- Existiría más de un tipo de OMV, las convencionales y un segundo tipo que incluirían membrana externa e interna bacterianas, así como contenido citoplásmico. Por tanto, existiría más de un mecanismo de formación de vesículas de membrana.
- Estas nuevas vesículas podrían contener DNA lo que explicaría la transferencia lateral de genes mediante vesículas que ha sido descrita por varios autores.
- La existencia de este nuevo tipo de vesículas no sería exclusiva de una especie bacteriana, sino que se trataría de un proceso fisiológico presente en diversas bacterias gramnegativas productoras de OMVs.

Los objetivos concretos son los siguientes:

1. Detectar un nuevo tipo de vesículas de membrana externa compuestas por una doble bicapa correspondiente a la membrana externa (OM) y a la membrana interna (IM) y que arrastran contenido citoplasmático. Esta detección se llevará a cabo sobre cortes ultrafinos de la cepa antártica, *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup>,

mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) después de criofijación a alta presión (*High Pressure Freezing*, HPF) y criosustitución (*Freeze substitution*, FS).

2. Aislar el total de vesículas de membrana externa de *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> y demostrar la producción de ambos tipos de vesículas de membrana mediante TEM y criomicroscopía electrónica de transmisión (Cryo-EM).
3. Determinar la frecuencia con la que se producen estas nuevas OMVs respecto al total de vesículas secretadas por la cepa mediante Cryo-EM.
4. Demostrar la presencia de DNA en el interior de las nuevas OMVs mediante cuantificación del DNA e inmunomarcaje del DNA sobre cortes ultrafinos de vesículas.
5. Demostrar la existencia de estas nuevas vesículas en las bacterias patógenas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Acinetobacter baumannii*. En las que se ha descrito la presencia de DNA, empleando la metodología anteriormente descrita.

La demostración de la existencia de este nuevo de vesícula es vital debido a que explica la encapsulación de DNA y, además, abre la puerta al estudio de otros componentes procedentes del citoplasma que también podrían ser incluidos en vesículas. En este caso nosotros hemos decidido centrarnos en el estudio del RNA, en concreto, de aquellos RNAs no codificantes denominados en bacterias, *small RNAs* (sRNAs).

Como hemos explicado, los sRNAs son pequeños transcritos que ejercen una regulación postranscripcional en el organismo. Éstos ejercen un control ágil de la fisiología bacteriana, gracias a que son rápidamente sintetizados, no requieren ser traducidos a proteínas para ser funcionales, y actúan sobre dianas ya “pre-existentes” en el citoplasma, como es el caso de proteínas reguladoras o mRNAs. Por lo tanto, permiten al organismo adaptarse velozmente a cambios bruscos en el ambiente y hacer frente a peligros que pudieran comprometer su supervivencia.

Generalmente, los sRNAs han sido estudiado principalmente como reguladores intracelulares. Sin embargo ¿qué pasaría si éstos pudieran ser incluidos en una vesícula, transportados y finalmente absorbidos por una célula receptora, cambiando su expresión? Entonces, estaríamos delante de una regulación intercelular ejercida por sRNAs, generando cambios en la expresión de la célula receptora y por tanto, estarían operando

como moléculas mediadoras de la comunicación bacteriana. Participando en el sistema de señalización *quorum sensing* (QS).

Hay estudios publicados describiendo la presencia de sRNAs en vesículas de bacterias gramnegativas. Por otra parte, se ha observado que células procedentes de mamíferos, son capaces de secretar vesículas que contienen un patrón concreto de microRNAs y que son transferidos a una célula receptora, cambiando su expresión. Así pues, considerando que la vesiculación es un proceso conservado a lo largo de la evolución, no sería descabellado el pensar que las bacterias gramnegativas también podrían vehicular sRNAs mediante vesículas, con el fin de regular la expresión de las células vecinas.

Como bacteria de estudio, se ha decidido trabajar con *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, debido a que es la bacteria modelo para el estudio de la formación de biofilms bacterianos. Además, se han descrito diversos sRNAs que estarían involucrados en la formación de estas comunidades multicelulares. Al mismo tiempo, el estudio mediante TEM de biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 describió la presencia de abundantes OMVs en las matrices extracelulares. Por último, esta bacteria está incluida en el estudio de la presencia del nuevo tipo de vesícula en bacterias gramnegativas patógenas. Por todas estas razones, *Pseudomonas aeruginosa* nos pareció la cepa modelo adecuada para estudiar la importancia biológica de los sRNA incluidos en OMVs.

A modo de resumen, la hipótesis del segundo capítulo propone que:

- Las bacterias gramnegativas secretarían mediante el nuevo tipo de membrana externa, RNAs no codificantes denominados sRNAs (*small*-RNAs). Estos sRNA se encontrarían encapsulados en el interior de la vesícula y por tanto protegidos de la acción de enzimas degradativos presentes en el medio.
- Estos sRNAs serían capaces de ser transferidos en vesículas a cepas receptoras, cambiando su expresión. La naturaleza de los sRNAs contenidos en vesículas dependería del estado fisiológico de la comunidad bacteriana, con el fin de ajustar la expresión global a unas necesidades cambiantes.

Los objetivos individuales han sido:

1. Poner a punto toda la metodología necesaria para la realización de la experimental: habilitar una zona libre de RNAsas, familiarizarse con las buenas prácticas de laboratorio para el manejo de RNA, extraer el RNA y evaluar la cantidad y calidad del RNA extraído. La evaluación del RNA se realizará



cualitativamente, mediante el análisis de los perfiles electroforéticos (Bioanalyzer) y cuantitativamente utilizando RT-PCR o técnicas fluorimétricas de cuantificación (Quibit).

2. Demostrar que el RNA asociado a vesículas efectivamente se encuentra en su interior mediante el ensayo de “RNase protection assay”.
3. Analizar el contenido de RNA asociado a vesículas y compararlo al de la célula, mediante RNA-seq de sRNAs y su posterior análisis bioinformático.
4. Caracterizar la tasa de vesiculación a lo largo de una curva de crecimiento, cuantificando mediante citometría de flujo de alta resolución el número de vesículas en los sobrenadantes de cultivos líquidos de *Pseudomonas* PAO1.
5. Cuantificar la expresión de tres sRNAs conocidos de *Pseudomonas* PAO1 (PhrS, CrcZ y RsmZ) mediante RT-PCR en aquellos puntos donde la tasa de vesiculación sea distinta. Realizar posteriormente una RNA-seq de cada uno de los puntos.
6. Determinar la capacidad de transferencia de sRNAs mediante vesículas, realizando ensayos de transferencia con mutantes delecionados.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. MICROORGANISMOS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

##### 1.1 MICROORGANISMOS

En este estudio se han empleado diferentes cepas con orígenes diversos, Tabla 3.1

**Tabla 3.1. Tabla con los microorganismos empleados.**

##### Cepas empleadas en la caracterización de OMVs y estudios de microscopía

Microorganismos	Descripción	Fuente o Referencia
<i>Shewanella vesiculosa</i> M7 <sup>T</sup>	Sedimento marino, Isla Decepción, Antártida	Bozal et al., (2009) CECT7339 <sup>T</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Colección internacional	CECT No
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Colección internacional	DMS 15130
<i>Acinetobacter baumannii</i> AB41	Aislamiento hospitalario	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Colección internacional	Aguilera et al., 2013
<i>Escherichia coli</i> Nissle ΔtolR	Mutante hipervesiculante	Este trabajo

##### Cepas empleadas en los estudios de transferencia de sRNAs en OMVs

Microorganismos	Descripción	Fuente o Referencia
PAO6679	PAO1 Δ <i>crcZ</i>	(Sonnleitner et al., 2009)
PAO6421	PAO1 Δ <i>rsmY</i> Δ <i>rsmZ</i>	(Kay et al., 2006)
<i>E. coli</i> DH5α	Utilizada en todo el trabajo rutinario	Laboratorio

##### 1.2 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivos empleados para el mantenimiento de las cepas y la realización de los diversos experimentos se detallan a continuación, así como su composición por litro.

TSA (*Tryptone Soya Agar*) (Pronadisa): Su composición por litro es:

Peptona de caseína	15g
Peptona de soja	5g
NaCl	5g

Agar	15g
------	-----

pH 7,3

- TSB (Tryptone Soya Broth) (Oxoid): Su composición por litro es:

Peptona de caseína	17g
--------------------	-----

Peptona de soja	5g
-----------------	----

NaCl	2,5g
------	------

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5g
---------------------------------	------

Glucosa	2,5g
---------	------

pH 7,3

*(En el estudio de RNA-vesículas hemos empleado TSB irradiado)*

- Mueller Hinton caldo (Oxoid): Su composición por litro es:

Infusión deshidratada de ternera	300 g
----------------------------------	-------

Hidrolizado de caseína	17,5g
------------------------	-------

Glucógeno	1,5g
-----------	------

Glucosa	20g
---------	-----

pH 7,3

- LB - Luria-Bertani (Oxoid): Su composición por litro es:

Triptona	10 g
----------	------

Extracto de levadura	5g
----------------------	----

NaCl	10g
------	-----

pH 7,2

- Agar Chocolate (*Tryptone Soya Agar*) (Oxoid): Su composición por litro es:

Hemoglobina	10g
-------------	-----

Peptona de caseína	7,5g
--------------------	------

Peptona de carne	7,5g
------------------	------

NaCl	5 g
------	-----

K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g
--------------------------------	-----

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
---------------------------------	-----

Harina maíz	1 g
-------------	-----

Solución enriquecimiento GCHI	10 mL
Agar	10 g
pH 7,2	

### 1.2.1 Suplementos de medios de cultivo.

Las concentraciones (C) empleadas para cada cepa se indican en la Tabla 3.2 así como las concentraciones stock de cada antibiótico.

**Tabla 3.2. Soluciones de antibióticos.**

Antibiótico	C stock (mg/mL)	C final <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ( $\mu$ g/mL)	C final <i>P. aeruginosa</i> ( $\mu$ g/mL)
Gentamicina	50	25	100
Tetraciclina	50	25	125
Cloranfenicol	50	20	400

## 1.3 CONDICIONES DE CULTIVO

### 1.3.1 Cultivos sólidos.

En cultivos sólidos, *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> se cultivó en placas de TSA a 15°C durante 48-72 horas. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *A. baumannii*, *E. coli* Nissle (EcN), y EcN  $\Delta$ *tolR* se cultivaron en placas de TSA a 37°C durante 18 horas, mientras que *Neisseria gonorrhoeae* se cultivó en agar chocolate a 37°C, en estufa de CO<sub>2</sub> (5%) durante 48h. Las modificaciones en los tiempos y temperaturas de incubación se especifican en cada apartado.

### 1.3.2 Cultivos líquidos.

En función de la especie bacteriana, se emplearon condiciones de crecimiento diferentes, aunque la preparación del preinóculo fue común para todas las cepas cultivadas en medio líquido. El preinóculo se preparó a partir de la cepa de interés cultivada en TSA, realizando una suspensión de turbidez de 0,5 de la escala de MacFarland. Inmediatamente, un matraz de 150 mL con 50 mL de medio se inoculó al 0,5% y se dejó crecer durante toda la noche en agitación.

A continuación, especificaremos las condiciones de crecimiento empleadas para cada cepa con el objetivo de aislar OMVs.

- ***Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup>.**

Para la obtención de OMVs de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>, se partió de 2 matraces muescados de 2000 mL de capacidad con 500 mL de medio de TSB. Estos fueron inoculados al 1% con un preinoculo de 24h. Los matraces se incubaron a 15°C durante 48 horas y con una agitación de 100 rpm.

- ***Acinetobacter baumannii*.**

Para la obtención de OMVs de *A. baumannii*, se partió de 2 matraces muescados de 2000 mL de capacidad con 500 mL de medio de Mueller Hinton (MH). Estos fueron inoculados al 1% con un preinoculo de 8 horas. Los matraces fueron incubados a 37°C durante 15 horas y a una agitación de 115 rpm.

- ***Pseudomonas aeruginosa* PAO1.**

Para la obtención de OMVs en *P. aeruginosa* PAO1, se partió de 2 matraces muescados de 2000 mL de capacidad con 500 mL de medio de TSB o LB. Estos fueron inoculados al 1% con un preinoculo de 15h. Los matraces fueron incubados a 37°C durante 8 horas y a una agitación de 115 rpm.

Para el estudio de RNA encapsulado en OMVs las condiciones de cultivo fueron las siguientes. La bacteria fue crecida en TSB irradiado (Oxoid) y se incubó durante 4,5 h, hasta una densidad óptica de 1,6. El preinóculo se incubó durante 15 horas y los matraces fueron inoculados al 1%.

- ***Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN).**

Para la obtención de OMVs en EcN, se partió de 1 matraz de 2000 mL de capacidad sin muescas con 1000 mL de LB. Estos fueron inoculados al 1% con un preinóculo de 8 horas. Los matraces fueron incubados a 37°C durante 15 horas y a una agitación de 200 rpm.

Si existe alguna variación en las condiciones de los cultivos líquidos, ésta se especifica en el correspondiente apartado de cada experimento.

### 1.3.3 Conservación y mantenimiento de las cepas

Las cepas se cultivaron en el correspondiente medio sólido y una vez crecidas se guardaron a 4°C y se resembraron cada siete días. Las cepas se mantuvieron también congeladas a -80°C y para ello se utilizó el sistema de mantenimiento CRYO-BILLES (AES, AEB400100, Combourg, Francia).

## 2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE OMVs

### 2.1 AISLAMIENTO DE OMVs

La obtención de las OMVs se realizó de acuerdo al procedimiento de Kadurugamuwa y Beveridge, (1995). En general, las OMVs fueron obtenidas a partir de sobrenadantes de cultivos líquidos en los que las cepas fueron cultivadas tal y como se describe en el apartado 1.3 de Condiciones de Cultivo. Para la obtención de OMVs de *N. gonorrhoeae*, la cepa se cultivó hasta confluencia en agar chocolate durante 48 horas, a 37°C en un incubador con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron resuspendidas, mediante el raspado de las células en una solución de PBS con el fin de obtener una suspensión bacteriana. Una vez obtenidos los cultivos de las distintas cepas, las células se separaron de las OMVs mediante centrifugación a 15.000 g durante 30 min a 4°C. Se descartó el pellet de bacterias y el sobrenadante se filtró a través de filtros de 0,45 µm (Whatman®). Las OMVs se obtuvieron por centrifugación a 42.000 g durante 1 h a 4°C en una centrífuga Avanti® J 20 XP (Beckman Coulter). Los sedimentos que contenían vesículas se resuspendieron en 50 ml de tampón 10 mM HEPES pH 6,8 o DPBS. La suspensión se filtró a través de filtros de jeringa de PET de 0,22µm (Millipore) y se volvieron a centrifugar a 42.000 g durante 1 h a 4°C. Finalmente, el pellet fue resuspendido en tampón estéril o agua en un volumen mínimo según experimento. La esterilidad de todas las muestras fue comprobada mediante la siembra de ~ 20 µL en una placa de TSA.

### 2.2 PURIFICACIÓN DE LAS OMVs

Las vesículas fueron purificadas por ultracentrifugación en gradiente de acuerdo al método adaptado de Horstman y Kuehn (2000). Para ello, se utilizaron gradientes de 45% de Optiprep® (Sigma) en tampón 10 mM HEPES/0,85% NaCl (p/v), pH 7,4. Las concentraciones de la solución de Optiprep/HEPES-NaCl, se añadieron sobre 4 mL de muestras de OMVs, en el siguiente orden: 4 ml de la solución al 40%, 4 mL de la solución al 35%, 6 mL al 30%, 4 mL al 25% y finalmente 2 mL al 20%. A continuación, se



centrifugaron los gradientes mediante ultracentrifugación a 100.000 g durante 20 h en Ultracentrífuga OPTIMA™ L-90K (Beckman Coulter). Se recolectaron cuidadosamente fracciones de 1 ml, que fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE al 12% y posterior tinción con azul de Coomassie. Las fracciones que presentaban un patrón de bandas iguales y que correspondían al patrón esperado de bandas de las OMVs de la cepa se combinaron, se resuspendieron en 10 mM de tampón HEPES, y se dializaron y concentraron a través de filtros Amicon® Ultra (Millipore) de 100 KDa. Finalmente, las OMVs purificadas fueron usadas para estudios proteómicos y de microscopia electrónica.

### **3. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE OMVs**

#### **3.1 PROTEÍNA POR BRADFORD**

La concentración de proteínas en OMVs fue determinada por el método Bradford, usando el reactivo estándar Bio-Rad (Laboratorios Bio-Rad, Alemania). La curva patrón se realizó con BSA.

#### **3.2 LPS POR PURPALD**

La concentración de LPS se calculó mediante el ensayo colorimétrico Purpald desarrollado por Lee C. & Tsai (1999). Para la generación de la curva estándar (50, 40, 30, 20, 10, 5 µg de LPS en 50 µL) se realizaron diluciones seriadas de una solución madre de 2 mg/ml de LPS purificado de *Pseudomonas aeruginosa* 10 (L9143, Sigma), diluido en agua. Las muestras se analizaron por duplicado y las lecturas se realizaron en el lector de microplacas SYNERGY HT (BioTek Instruments, Inc.) a 550 nm. Para la curva estándar para cuantificar el LPS de *E. coli* Nissle se empleó el azúcar Kdo (0,05/ 0,1/ 0,2/ 0,3/ 0,4 y 0,5 mM Kdo en 50 µL)

#### **3.3 CUANTIFICACIÓN OMVs POR SU CONTENIDO EN LÍPIDOS**

El contenido relativo de lípidos asociados a OMVs fue determinado empleando el reactivo fluorescente FM4-64 (Thermofisher). Una alícuota de OMVs resuspendidas en PBS se incubó con una concentración final del reactivo FM4-64 de 5 µg/mL durante 5 minutos a temperatura ambiente. Como controles negativos de la fluorescencia, se emplearon una muestra de OMVs sin teñir y tampón PBS con FM4-64. Se realizaron las lecturas por duplicado y se excitó la muestra a una longitud de onda de 515 nm y se midió 640 nm con el lector de placas SYNERGY HT (BioTek Instruments, Inc.).

### 3.4 CITOMETRÍA DE ALTA RESOLUCIÓN

La determinación del número de OMVs en suspensión se realizó mediante citometría de flujo de alta resolución, tal como describe Wieser (2014) con algunas modificaciones. Las suspensiones de OMVs fueron teñidas con FM4-64 a una concentración final de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, fueron inmediatamente analizadas mediante el citómetro BD FACSAria™ Fusion III (BD Bioscience). Se empleó como discriminante la fluorescencia en lugar de tamaño. Las muestras fueron diluidas con PBS filtrado por 0,22  $\mu\text{m}$  hasta conseguir una frecuencia de eventos  $< 10.000$  eventos/segundo y empleando la velocidad de flujo menor que permite el instrumento (flowrate = 2). Los tiempos de adquisición fueron de 1 minuto y se registraron durante 30 segundos. El número de partículas/mL fue determinado mediante el uso de un patrón de esferas fluorescentes con un tamaño de 100 nm (Fluorospheres, Life technologies). El blanco del instrumento fue establecido mediante el análisis de PBS filtrado teñido con FM4-64 y se ajustó hasta conseguir una frecuencia de eventos  $< 20$  eventos/s. Por otra parte, la potencia de excitación del láser empleada fue ajustada con el fin de descartar la autofluorescencia de la muestra. Para ello, se empleó una suspensión de vesículas sin teñir y se ajustó la potencia del láser hasta detectar  $\sim 20$  eventos/s.

Además, para validar este método de cuantificación, es decir, asegurarnos que la cantidad de vesículas en suspensión fuera proporcional al número de eventos detectados en el citómetro, se realizaron diluciones seriadas de la muestra (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) y se analizaron en el citómetro. Por otra parte, se cuantificó la concentración de vesículas mediante proteína y LPS. El experimento se repitió tres veces, con dos replicados técnicos.

## 4. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

### 4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

#### 4.1.1 Tinción negativa.

Se tomó un volumen de 10  $\mu\text{l}$  de la muestra correspondiente a las OMVs obtenidas a partir de las diferentes cepas, según el procedimiento descrito en el Apartado 2. Se colocó sobre parafilm y a continuación se dispuso la rejilla de microscopía electrónica de cobre

200 MESH recubierta con Formvar-carbono sobre la gota de OMVs. Se dejó adsorber la muestra durante 2 min y luego se lavó la rejilla colocándola sobre una gota de agua bidestilada durante 10 s. Rápidamente se depositó la rejilla sobre el agente de tinción (acetato de uranilo, AU) al 2% (m/v) durante 1 min. Inmediatamente se retiró el exceso de AU con papel de filtro y se dejó secar la muestra 24h. Una vez preparadas las rejillas con las muestras, se colocaron en un desecador hasta su observación en microscopio electrónico de transmisión Tecnai Spirit (FEI Company, Holanda) a 120 kv. Las imágenes fueron captadas con la cámara CCD (FEI, Eindhoven, Holanda) y procesadas a través del programa AnalySIS (Soft Imagine Systema, Suiza).

#### **4.1.2 Criofijación por alta presión y Criosustitución (*High Pressure Freezing and Freeze- Substitution, HPF-FS*).**

Las colonias de bacterias para criofijar fueron seleccionadas bajo estereomicroscopio y se transfirieron a planchettes de diámetro 1,5 mm y profundidad 200  $\mu\text{m}$ . Inmediatamente se procedió a la criofijación por alta presión utilizando el equipo Leica EM Pact (Leica, Viena, Austria) a una presión de 2100 bar y con una velocidad de disminución de temperatura de 8000°C/s. Las planchettes fueron entonces mantenidas en nitrógeno líquido hasta su uso.

Las muestras crioinmovilizadas se criosustituyeron en acetona pura conteniendo tetróxido de osmio al 2% (m/v) y acetato de uranilo 0,1% (m/v), durante 72 h a -90°C en un equipo Leica AFS (Automatic Freeze Substitution). Se incrementó la temperatura de forma gradual a 5°C/h, hasta llegar a los 4°C. Las muestras se mantuvieron 2 h a 4°C y luego la temperatura se elevó hasta 25°C donde se mantuvo durante 2 h. Se realizaron tres lavados sucesivos con acetona durante 15 min a temperatura ambiente y las muestras se incluyeron en resina Epon-acetona: 1:3 durante 2 h; 2:2 durante 2 h, 3:1 durante 16 h y finalmente en Epon pura durante 30 h. Finalmente se procedió a la polimerización de la resina durante 48 h a 60°C.

#### **4.1.3 Cortes ultrafinos.**

Los cortes semifinos de 1  $\mu\text{m}$  fueron realizados para poder localizar la zona de la muestra deseada en un microscopio óptico. Posteriormente mediante ultramicrotomo (Leica, UCT), se realizaron cortes ultrafinos, de 50-60 nm, que se recogieron en rejillas recubiertas con Formvar y carbono. Las secciones obtenidas se contrastaron con acetato de uranilo al 2% (p/v) en agua durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación

se procedió a lavar la muestra con abundante agua y se contrastó con citrato de plomo aproximadamente durante 5-6 min en presencia de lentejas de NaOH y en una atmósfera cerrada en ausencia de CO<sub>2</sub>.

#### **4.1.4 Inmunomarcaje de DNA de cortes ultrafinos de OMVs.**

En primer lugar, las OMVs se aislaron y se trataron con DNAasa I pancreática (Sigma) para eliminar restos de DNA presente en el exterior de las vesículas. Las muestras se prepararon mediante HPF-FS, pero se substituyeron en este caso con la resina Lowicryl-HM20 idónea para la realización de inmunomarcajes. Posteriormente, se realizaron cortes ultrafinos de las OMVs tal como se describe en el apartado anterior. A continuación, se precedió al inmunomarcaje.

Las rejillas con los cortes se invirtieron y colocaron sobre una gota de PBS 0,1M y se dejaron flotar durante 3 minutos. Seguidamente, se realizó el bloqueo de las rejillas en una solución de PBS 0,1M/glicina 50 mM, a continuación se realizó un lavado con PBS 0,1M (1 gota durante 3 minutos) y se bloquearon las rejillas con 5% albumina bovina sérica (BSA, Sigma)/PBS 0,1M (1 gota durante 12 minutos). Nuevamente, se procedió a un nuevo bloqueo de las rejillas en BSA 1% / PBS 0,1M (1 gota por 8 segundos). A continuación, las rejillas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente a una IgM monoclonal específica de ratón en contra de dsDNA, diluida ½ en BSA/ PBS 0,1M (Novus Biologicals, Clone AC-30-10) durante 45 minutos. Al finalizar, se lavaron en Tween-20 0,25% /PBS 0,1M (5 gotas en 5 minutos) y se realizó un nuevo bloqueo con BSA 0,1% BSA/PBS 0,1M (1 gota durante 3 minutos). Las rejillas se incuban durante 30 minutos con el anticuerpo secundario específico contra la IgM de ratón (Jackson, Lot 84359) diluido 1/20 en BSA 0,1% BSA/PBS 0,1M asociado a nanopartículas de oro de 12 nm y se lavaron con agua bidestilada y se secaron con papel de filtro.

Por último, se contrastaron las rejillas mediante con una solución de acetato-metanol al 2% (1 gota durante 5 minutos), 70% metanol (1 gota durante 3 minutos), 50% metanol (1 gota cada 3 minutos) y 30% metanol (1 gota cada 3 minutos). Las rejillas fueron lavadas con agua y se secaron durante 20 minutos al aire. Para finalizar el contrastado, las rejillas se tiñeron con una solución de citrato de plomo durante 2 minutos y se retiró el exceso de agente de tinción con agua.

Para asegurar la especificidad del inmunomarcaje se realizaron diferentes controles. En el primer control se omitió el anticuerpo primario. En el segundo, antes del

inmunomarcaje, se realizó un tratamiento de las rejillas con DNAsa I a una concentración de 1 mg/ml en PBS 0,1M y MgCl<sub>2</sub> 7 mM de durante 7 horas. En el tercer control se utilizó una IgM primaria contra una proteína de *Plasmodium falciparum*. Previo al inmunomarcaje todas las soluciones fueron tratadas con DNAsa para evitar la contaminación de DNA procedente de los reactivos y posteriormente el enzima fue inactivado a 80°C,

## 4.2 CRYO-EM

### 4.2.1 Visualización de muestras de OMVs preparadas por *Plunge-Freezing* (PF).

Las suspensiones de OMVs fueron preparadas mediante *Plunge-Freezing* para ser visualizadas en el Cryo-EM. Para su visualización, las OMVs se resuspendieron en tampón de HEPES 50 mM a pH 6,8. Una gota de esta suspensión fue depositada sobre rejillas de carbono perforadas tipo Quantifoil R 2/2 grids (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Germany) y se dejó contactar la muestra entre 2 y 4 minutos. Previamente, las rejillas fueron sometidas a un tratamiento “*glow-discharged*” para permitir una dispersión uniforme de la muestra sobre la rejilla. El exceso de líquido se absorbió con un papel de filtro, dejando una fina capa de muestra en la rejilla. A continuación, se vitrificaron las muestras mediante la inmersión de la rejilla en etano líquido, empleando el instrumento Vitroblot (FEI Company, Eindhoven, Netherlands). Las muestras vitrificadas se mantuvieron en nitrógeno líquido a un 100% de humedad. La visualización de las muestras se llevó a cabo en el Crio-microscopio Tecnai F20 (FEI Company) a 200 kV, a una temperatura entre -170°C a -175°C. Las imágenes se captaron con cámara Eagle 4k x 4k CCD (FEI Company). El análisis de los distintos tipos de OMVs y la proporción de las mismas se realizó con el programa *analySIS* (Soft Imagine System, Switzerland).

### 4.2.2 Observación mediante Cryo-EM de suspensiones bacterianas preparadas por *Plunge-Freezing* (PF).

Las suspensiones bacterianas enriquecidas en OMVs de *N. gonorrhoeae*, *Pseudomonas* PAO1 y *A. baumannii* AB41 fueron visualizadas mediante Cryo-EM. Para la preparación de las suspensiones bacterianas, *Pseudomonas* PAO1 y *A. baumannii* AB41 fueron incubadas overnight en 50 mL de TSB. *N. gonorrhoeae* fue cultivada en agar chocolate durante 24 horas y las células fueron resuspendidas en 50 mL de PBS.

Para eliminar una gran parte de las células, los cultivos fueron centrifugados a 3.000 g durante 10 minutos y el sobrenadante fue centrifugado a 40.000 g durante 30 minutos en la centrífuga Avanti J-20 XP (Beckman Coulter, Inc). El pellet fue resuspendido con 50 ml de 50 mM HEPES pH 6,8 y se volvió a centrifugar a 40.000 x g durante 30 minutos. Finalmente, el pellet se resuspendió en el volumen adecuado de 50 mM HEPES pH 6,8 ajustando la turbidez a 1 de la escala de McFarland para su correcta visualización en Cryo-EM.

## **5. PROTEÓMICA**

### **5.1 GEL DE PROTEÍNAS 1D SDS-PAGE**

Los geles de proteínas se hicieron de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook & Russell (2006). La solución del gel de resolución se realizó al 12% y se hizo de la siguiente forma: 3,3 mL de agua destilada, 4 mL de solución de acrilamida 29:1 al 30% (161-0156, Bio-rad), 2,5 mL de tampón Tris-HCl 1,5M (pH 8,8), 100  $\mu$ L SDS 10% (p/v), y 100  $\mu$ L de persulfato de amonio 10% (p/v). Para catalizar la polimerización se añadieron a la mezcla, 4  $\mu$ L de n,n,n',n'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) y tras homogeneizar la solución, ésta se depositó entre los dos cristales hasta llegar a una altura de unos 2 cm desde el borde superior del gel. También se añadió una capa de agua destilada para nivelar el gel y se dejó polimerizar durante 45 minutos. El gel de apilamiento se preparó mezclando 2,7 mL de agua, 0,67 mL de acrilamida, 0,5 mL Tris- HCl 1M (pH 6.8), 40  $\mu$ L SDS 10%, 40  $\mu$ l de persulfato de amonio 10% (p/v) y 4  $\mu$ L TEMED y se colocó a continuación del gel separador.

Las muestras se prepararon diluyendo una cantidad concreta de OMVs hasta un volumen máximo de 12  $\mu$ L y a continuación, se añadieron 3  $\mu$ L del tampón de carga SDS 5X. Las muestras fueron hervidas durante 5 minutos a 95°C para desnaturalizarlas y ser cargadas en los pocillos. En general, en cada pocillo se añadió una cantidad de OMVs correspondiente a unos 10  $\mu$ g de proteína, calculada mediante el ensayo de Bradford y en un volumen máximo de 15  $\mu$ L. Las proteínas fueron separadas mediante el sistema de electroforesis Mini-Protean III de Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU) con una fuente de alimentación PowerPac 300 (Bio-Rad) a 120 V durante 45 minutos. Se utilizó como tampón de corrida PAGE 1X (Tris 25 mM, pH 8,5), glicina 200 mM, SDS 0,1% (p/v). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (G-250) (Fluka).

## 5.2 ESPECTROMETRIA DE MASAS DE *Neisseria gonorrhoeae*

Con el fin de identificar las proteínas presentes en las OMVs de *N. gonorrhoeae* se realizó un estudio proteómico a partir de geles 1D SDS-PAGE de OMVs purificadas de *N. gonorrhoeae*. Una vez tuvimos las bandas proteicas separadas en los geles de 1D SDS-PAGE, estas fueron cortadas con ayuda de un bisturí y se lavaron con tampón de bicarbonato amónico y acetonitrilo. A continuación, se realizaron lavados secuenciales con tampón bicarbonato amónico y acetonitrilo y las proteínas fueron digeridas durante toda la noche a 37°C con 0,27 nM de tripsina. Los péptidos fueron extraídos de la matriz del gel con una solución al 10% (v/v) de ácido fórmico y acetonitrilo, luego fueron concentrados y secados mediante vacío.

Los péptidos obtenidos al realizar la digestión con tripsina se analizaron por un espectrómetro de masas en tándem (LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Scientific) conectado on-line con un equipo de cromatografía líquida (nanoAcquity, Waters). La base de datos se generó recopilando todos los péptidos procedentes de *Neisseria gonorrhoeae* compilados en las bases de datos *Uniprot-SwissProt* y *Uniprot-TrEMBL* (Setiembre, 2013). El software *Thermo Proteome Discover* (v.1.3.0.339) fue empleado para comparar las masas de los péptidos identificados en las OMVs de *N. gonorrhoeae* con los incluidos en la base de datos. Los resultados fueron filtrados y solamente fueron incluidas aquellas proteínas identificadas por al menos 2 péptidos de alta confianza ( $FDR \leq 0,01$ ). La localización subcelular fue determinada por el programa PSORTb v3.0.2.

## 6. DETECCIÓN MEDIANTE WESTERN BLOT DE LA PROTEÍNA Hfq

El Western Blot se realizó siguiendo el método descrito por Sonnleitner y colaboradores (2017). Cantidades de OMVs de 10, 15 y 25  $\mu\text{g}$  de LPS fueron separadas mediante geles de 1D SDS-PAGE al 12% a 130V durante 1,5 horas. A continuación, las bandas de proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, mediante el sistema Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-rad) durante 30 minutos a 20-25 V. Como control de la transferencia de proteínas se añadió en un carril del gel de poliacrilamida un marcador de peso molecular preteñido. Una vez realizada la transferencia las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBS y leche deshidratada al 5% y se dejó a 4°C overnight. Pasado este tiempo, se procedió a realizar una serie de lavados con TBS (3 lavados de 10 minutos). Una vez finalizados, se inició el inmunomarcaje, se incubó el anticuerpo primario anti-Hfq (Pineda) obtenido en conejo durante 1 hora y media. A

continuación, se realizaron tres lavados en TBS y se procedió al marcaje con el segundo anticuerpo *anti-rabbit* conjugado a una fosfatasa alcalina (Sigma). El revelado se realizó utilizando el sustrato cromogénico cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato (BCIP). Como control del western se añadió a un carril del gel 5  $\mu$ L de proteína Hfq cedida por el laboratorio del Dr. Udo Bläsi.

### 6.1 SOLUCIONES UTILIZADAS

- Tampón de transferencia

Glicina	2,9 g
Tris	5,8 g
20% SDS	1,85 mL
Metanol	200 mL
Agua c.s.p	1L
pH=8,3	

- TBS 10x

NaCl	80 g
KCl	2 g
Tris	30 g
Agua c.s.p	1L
pH=7,5, ajustar con HCl	

- Solución de anticuerpo ( dilución 1:10000)

TBS 1x	19 mL
Solución del 10% BSA	2 g
Anticuerpo	2 $\mu$ L

- Tampón de la fosfata alcalina

NaCl	5,8 g
MgCl <sub>2</sub>	1 g
Tris	12 g
Agua c.s.p	1L



pH=9,5 , ajustar con HCl

- Solución NTB/BCIP

Buffer de fosfatasa alcalina	10 mL
NBT (nitroblue tetrazolium 0.5 g/ 10 ml 70% DMF)	66 µL
BCIP (0.5 g 5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato en 100% DMF)	33 mL

### **7. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE DNA ASOCIADO A OMVs MEDIANTE EL ENSAYO Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit**

La cuantificación de DNA por fluorimetría se realizó para determinar la cantidad de DNA presente en el interior de las vesículas. Éste se cuantificó mediante el ensayo de *Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) descrito previamente por Renelli y colaboradores (2004) con algunas modificaciones. Se prepararon dos muestras de OMVs correspondientes a 30 µg de proteína. Una muestra fue tratada con 50 µg/mL de DNasa pancreática (Sigma) y MgCl<sub>2</sub> 10 mM durante 1h a 37°C para digerir el DNA asociado al exterior de las vesículas. A continuación, se inactivó la DNAsa mediante un tratamiento a 80°C durante 10 minutos. Ambas muestras se lisaron con una solución de Triton X-100 al 0,125%. Posteriormente, las muestras se procesaron mediante el kit comercial de *Quant-IT™ PicoGreen®* siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una curva patrón de bajo rango, que permite cuantificar un rango de 0,25 pg/mL a 25 ng/mL. Se partió de una solución de 50 ng/mL de DNA y se diluyó para obtener las concentraciones deseadas (0,025/ 0,25/ 2,5/ 25). La lectura se realizó en el lector de placas de *Modulus Microplate Multimode Reader* (Turner Biosystems) a las longitudes de onda 490 nm de excitación y 520 nm de emisión. Las OMVs se obtuvieron de tres experimentos independientes y los resultados se expresan como la media ± desviación estándar.

### **8. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE ATP ASOCIADO A OMVs**

El ATP contenido en OMVs de distintas bacterias fue calculado mediante el kit comercial *BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay* (Promega). Una muestra de vesículas fue aislada de cultivos en fase exponencial y guardada a -80°C con el fin de evitar la degradación del ATP. Alícuotas de 100 µL de vesículas aisladas de cada cepa fueron procesadas siguiendo las instrucciones del fabricante y la luminiscencia fue medida en

*Modulus Microplate Multimode Reader* (Turner Biosystems). Previo a la medida del ATP, se comprobó la esterilidad de cada lote de vesículas, con el fin de descartar la presencia de bacterias que pudieran interferir en la evaluación del contenido de ATP.

La curva patrón se realizó mediante diluciones seriadas 1/10 (1  $\mu\text{M}$  to 10 pM), a partir de una solución patrón de Adenosina 5'-triphosphato de sodio de 1  $\mu\text{M}$  (Promega). La concentración de ATP de cada muestra fue determinada mediante su extrapolación de la señal luminiscente a la curva patrón y la señal de cada muestra fue normalizada respecto a la cantidad de proteína de cada alícuota de vesículas. Las OMVs se obtuvieron en dos experimentos independientes y cada determinación fue realizada por duplicado y los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar.

### **9. ESTABLECIMIENTO DE UNA ZONA DE TRABAJO RNase-FREE**

Trabajar con RNA requiere tomar precauciones extras que no son necesarias para la manipulación de DNA, ya que el RNA por su propia estructura es intrínsecamente más débil que el DNA. Además, la presencia de la enzima RNAsa es ubicua y es extremadamente resistente y muy difíciles de inactivar. Como ejemplo, pondríamos, que su actividad se mantiene tras el autoclavado.

Así pues, antes de trabajar con RNA es esencial el establecimiento de una zona libre de RNAsas y al mismo tiempo, estar familiarizado con unas buenas prácticas de laboratorio para la manipulación de RNA, con el fin de evitar la degradación de nuestras muestras y conseguir resultados reproducibles. Además, es importante tener en cuenta que las cantidades de RNA asociadas a vesículas suelen ser ínfimas, por lo que es preciso extremar las precauciones para proteger las muestras.

La piel humana ha sido reconocida como una fuente principal de contaminación de RNAsas. Aunque también pueden proceder de partículas de polvo, en las que hay microorganismos depositados y que pueden llegar a la muestra por el aire. Otra fuente que se ha tener en cuenta son los reactivos; es importante utilizar reactivos RNase-free y además utilizar técnicas microbiológicas adecuadas para evitar su contaminación por bacterias o hongos. Por último, se ha de valorar que las RNAsas pueden estar presentes intrínsecamente en nuestra propia muestra.

Por todo esto, en el laboratorio se establecieron las siguientes pautas de trabajo.

- Se habilitó una zona independiente del laboratorio con cabina de flujo laminar para la manipulación de muestras de RNA y reactivos. Antes de cada uso, se procedió a la descontaminación de RNAsas de la superficie de la cabina mediante el reactivo RNase zap® (Ambion). Seguidamente, la superficie fue desinfectada mediante el uso de una solución de etanol al 70% que se preparó empleando agua comercial *RNase-free* (Sigma).
- Se destinaron unas pipetas automáticas para el uso exclusivo de la manipulación de RNA.
- Para evitar la presencia de RNAsas procedentes de motas de polvo depositado en la superficie, todo el material introducido en la cabina (puntas, pipetas, eppendorfs, reactivos, gradillas) se descontaminó previamente con la solución *RNase zap*®.
- Para evitar la contaminación por RNAsas procedentes de la piel se emplearon guantes en todo momento y se cambiaron constantemente. Además, se utilizó una bata con puño cerrado de uso exclusivo para la manipulación de RNA.
- Se empleó material de plástico de un solo uso y puntas estériles con filtro *RNase free*. El material de vidrio se descontaminó por incineración a 200°C durante 24 horas.
- Se evitó el empleo de material autoclavado y el uso de hielo durante las extracciones y tratamientos del RNA para evitar una posible fuente de contaminación.
- En todo momento se empleó agua comercial libre de RNAsas (Sigma). Todos los reactivos *RNase-free* se alicuotaron en volúmenes adecuados bajo condiciones de esterilidad, utilizando cabina, y tomando las máximas precauciones para evitar la contaminación con RNAsas del ambiente. Los reactivos y sus alícuotas fueron guardados en sitios distintos a los reactivos convencionales.
- Periódicamente, se comprobó la estabilidad del RNA vesicular mediante su incubación a 37°C durante 30 minutos y el posterior análisis de los perfiles electroforéticos de RNA vesicular antes y después de la incubación. También se valoró la presencia de RNAsas en los kits de extracción una vez abiertos. Aquellos kits que disminuyeron la calidad de RNA bacteriano a un RIN < 8,5, fueron descartados, asumiendo una contaminación por RNAsas por mala manipulación.

## **10. AISLAMIENTO DEL RNA PRESENTE EN OMVs Y CÉLULAS DE *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**

Previamente a la extracción de RNA, las muestras de vesículas aisladas fueron sometidas a un tratamiento externo de RNAsa A/T1 (Thermo Fisher Scientific) de 10 ng/ $\mu$ L durante 30 minutos a 37°C, para degradar el RNA que pudiera estar asociado a la superficie de las vesículas. A continuación, para evitar la posible interferencia del enzima en la extracción de RNA se realizó una dilución 1/100 de las vesículas en agua y se volvieron a centrifugar a 40.000 g durante 1 hora a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en agua, utilizando el menor volumen posible. Para la extracción de RNA se partió de una muestra de vesículas equivalente a 70  $\mu$ g de LPS (volumen < 50  $\mu$ L) y se procedió al aislamiento del RNA empleando el quit miRNAs (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para finalizar, el RNA se diluyó en 30  $\mu$ L en agua.

Para la extracción del RNA bacteriano, 700  $\mu$ L de cultivo bacteriano fueron centrifugados a 10.000 g. El sobrenadante fue descartado y se eliminaron los restos del medio con una pipeta, para proceder a la extracción del RNA empleando el Kit miRNAs (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA fue diluido en 50  $\mu$ L de agua RNase-free y la concentración y calidad de RNA bacteriano se determinó por espectrofotometría empleando el equipo Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific™).

## **11. CUANTIFICACIÓN FLUORIMÉTRICA DEL RNA TOTAL MEDIANTE *Qubit RNA HS Assay Kit*™**

Se determinó la concentración del RNA extraído de muestras de vesículas mediante fluorimetría con el kit comercial *Qubit™ RNA HS Assay Kit* (Thermo Fisher), que permite la cuantificación selectiva de RNA en un rango comprendido entre los 250 pg/ $\mu$ L y los 100 ng/ $\mu$ L. Para ello, 3  $\mu$ L de cada muestra fueron procesados siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de la señal se realizó mediante un Fluorímetro Qubit (Thermo Fisher). Las cuantificaciones mediante el ensayo *Qubit™ RNA HS* fueron realizadas en los servicios de genómica del IDIBAPS.

## **12. DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES ELECTROFORÉTICOS DEL RNA POR BIOANALYZER**

Para determinar el perfil electroforético del RNA total extraído de las OMVs se realizó un análisis mediante *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent) empleando el kit *Agilent RNA*

*6000 Pico Kit*, debido a la baja concentración de RNA. Para poder resolver la franja de RNA de tamaño inferior a 100 nt se empleó el kit de *Agilent Small RNA*. Para la determinación de la calidad del RNA celular se realizó el análisis mediante el kit de *Agilent 6000 Nano* y se valoró el RIN (número que determina la calidad del RNA extraído, siendo 10 el máximo valor). Todas las muestras de RNA bacteriano con las que se trabajó tuvieron un valor  $> 8,5$ . Para todos los tipos de ensayo se utilizaron 1,5  $\mu\text{L}$  del volumen eluido de RNA en agua. El procesado de las muestras fue realizado en los servicios de genómica del instituto IDIBAPS.

### **13. CUANTIFICACIÓN DE sRNAs MEDIANTE RT-PCR**

#### **13.1. TRATAMIENTO CON DNAsa DEL RNA EXTRAIDO**

Ninguno de los métodos de extracción de RNA consigue aislar el RNA completamente puro, ya que también se extrae una pequeña parte de DNA. Por esta razón, antes de realizar la retrotranscripción (RT), se debe realizar un tratamiento del RNA con DNAsas. Este tratamiento se realizó con la *DNase TURBO DNA-free™* (Ambion, Thermo Fisher), por dos razones. Es la DNAsa más potente del mercado y además, se puede eliminar mediante una centrifugación, evitando realizar una inactivación por calor que deterioraría la calidad del RNA.

Por ello, 12  $\mu\text{L}$  del eluato de RNA fueron tratados con 1  $\mu\text{L}$  de *DNase TURBO DNA-free™* y con 1,2  $\mu\text{L}$  de tampón 10X y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de tampón de inactivación a la muestra y se agitó suavemente, dejando reaccionar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó la muestra a 10.000 g durante 1,5 minutos. Cuidadosamente, se pipetearon 10  $\mu\text{L}$  de la solución de RNA evitando tocar el precipitado blanco. Estos 10  $\mu\text{L}$  fueron transferidos a un nuevo eppendorf *RNAse-free* y se diluyeron con 10  $\mu\text{L}$  de agua. Los 20  $\mu\text{L}$  se separaron en 2 alícuotas. La primera se empleó para la conversión del RNA a cDNA y posterior cuantificación por RT-PCR. La segunda alícuota fue empleada como control del tratamiento de DNAsa. El RNA tratado fue guardado a -80°C hasta su transcripción inversa. Para el tratamiento con DNAsa del RNA bacteriano, se emplearon 2 unidades de DNAsa y 2,4  $\mu\text{L}$  de tampón de inactivación.

### 13.2. CONVERSIÓN DEL RNA A cDNA (RETROTRANSCRIPCIÓN).

La transcripción inversa del RNA a cDNA se realizó con el kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* con inhibidor de RNAsa (Applied Biosystems™), empleando cebadores aleatorios para la conversión cuantitativa de la hebra de RNA a cDNA y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para RNA vesicular, se retrotranscribieron 10 µL de RNA tratado con DNAsa, mientras que para RNA bacteriano, se realizó la transcripción inversa de un volumen equivalente a 5 ng de RNA y se llevaron a 10 µL, en una reacción de 20 µL. La retrotranscripción se realizó en el termociclador 2720 de Applied Biosystems y utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante.

### 13.3 CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE LA EXPRESIÓN DE LOS sRNAs MEDIANTE Real time –PCR CUANTITATIVA (RT-qPCR)

#### 13.3.1 Cebadores.

Los cebadores empleados en la qPCR están detallados en la Tabla 3.3. Estos fueron diseñados con Primer3 (versión 0.4.0), a una temperatura de alineamiento de (T<sub>m</sub>) de 60°C y con un tamaño de amplicón > 100 nt.

**Tabla 3.3 Cebadores empleados en la qPCR (T<sub>m</sub> 60°C).**

Cebadores	secuencia (5' → 3')	Referencia
13F_rsmZ_UB	GTACAGGGAACACGCAACC	(Sonnleitner & Bläsi, 2014)
13R_rsmZ_UB	CCCCGCCCACTCTTCAG	(Sonnleitner & Bläsi, 2014)
01F_PhrS	CAACTGGAGGCCATCAACAT	Este trabajo
03R_PhrS	CTAAGTGCCTTGCGTGCTCT	Este trabajo
02F_crcZ	GAGGCGCAGCTAACTGATTC	Este trabajo
02R_crcZ	AGGCTGGGAGTTCAATAGCA	Este trabajo

#### 13.3.2 Optimización de la qPCR y condiciones establecidas.

Para la cuantificación de sRNAs mediante RT-PCR se utilizó el reactivo *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems™, Thermo Fisher), que contiene un premezclado con todos los componentes necesarios para la PCR, excepto los cebadores, DNA molde y agua. La detección directa del producto de PCR se controla midiendo el aumento de

fluorescencia causada por la unión del fluorocromo verde *SYBR*® al DNA de doble cadena.

La concentración de cebadores se optimizó con el fin de determinar la mínima concentración de cebador que permitiera obtener el menor Ct (*Threshold Cycle*) con el máximo  $\Delta R_n$ , descartando la generación de más de un producto de PCR (*dissociation curve*). Para ello, se realizaron diferentes mezclas empleando diferentes concentraciones de cebadores (Tabla 3.3), siguiendo las instrucciones descritas en el manual proporcionado por Thermo Fisher para el uso de *SYBR*® *Green PCR Master Mix* y *SYBR*® *Green RT-PCR Reagents Kit*. Se empleó una matriz de eficiencia descrita en la Tabla 3.4 realizando 4 réplicas para cada dilución. Además, se emplearon mezclas sin DNA molde con fin de descartar la presencia de contaminantes en los reactivos.

**Tabla 3.4. Matriz de concentraciones de cebadores con una cantidad fija de DNA molde.**

Reverse (nM)	Forward (nM)		
	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

Para establecer la concentración óptima de cDNA a utilizar en la qPCR, descartar la presencia de inhibidores y calcular la eficiencia de la amplificación de nuestros cebadores, se realizaron diluciones seriadas del cDNA vesicular (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32) y se realizó la qPCR de las muestras. También se determinó la eficiencia de la amplificación de los cebadores mediante el cálculo de la pendiente, que debería tener unos valores situados entre -3,1 ~ -3,6 (equivalente a 110 ~ 90% de eficiencia de la reacción) (Tabla 3.5).

La cuantificación de sRNAs se realizó de forma absoluta, debido a que no se conoce ningún gen cuya expresión sea constante (“*housekeeping gen*”) en vesículas. Por ello se tuvo que realizar una curva estándar con diluciones seriadas del gen de interés. Generalmente, se recomienda que se hagan a partir de RNA, pero decidimos realizar la curva estándar a partir de sondas de DNA de nuestro gen de interés que fueron sintetizadas por IDT Technologies (Integrated DNA Technologies, Inc, EE.UU). Se diseñó una curva patrón siguiendo las instrucciones detalladas en el manual *Creating*

*Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR* (Applied Biosystems™). La curva patrón estuvo formada por 7 puntos de diluciones seriadas de 1/10 con un rango comprendido entre las 0 copias hasta las  $3 \times 10^6$  copias del sRNA de estudio, que corresponden a unos Cts comprendidos entre 15 y 30. Las condiciones para cada sRNA están detalladas en la Tabla 3.4.

La RT-qPCR se realizó en placas *MicroAmp™ Optical 384-Well* (Thermo Fisher), con un volumen final de PCR de 11  $\mu$ L (10  $\mu$ L master mix y 1  $\mu$ L de cDNA). La placa se llenó empleando pipetas automáticas. Posteriormente la reacción de amplificación fue llevada a cabo en el termociclador de qPCR *ABI 7900 Real-time PCR* (Applied Biosystems™) y las condiciones de reacción utilizadas fueron las establecidas en el protocolo de *EL SYBR® Green PCR Master Mix*. Para el análisis de los datos se ajustaron manualmente los valores Ct, con un *Threshold* de 0,2. Se sembraron al menos tres réplicas por punto, aceptando como máximo una desviación estándar de la muestra de  $\pm 0,5$ . Los valores medios de Ct de las muestras fueron extrapolados a la curva patrón para conocer el número de copias/mL.

**Tabla 3.5. Concentración de cebadores y pendiente de rendimiento.**

sRNA	[cebadores]	pendiente
<b>PhrS</b>	900/900	-3,4
<b>CrcZ</b>	50/300	-3,2
<b>RmsZ</b>	900/900	-3,1

#### **14. ENSAYO DE PROTECCIÓN DEL RNA VESICULAR FRENTE UN TRATAMIENTO CON RNAsas (RNase protection assay)**

Este ensayo fue realizado para determinar si el RNA se encontraba interiorizado en las OMVs. Para este ensayo una muestra de OMVs de *Pseudomonas* PAO1 obtenida a partir de 1,5 L de sobrenadante, fue dividida en tres alícuotas idénticas, que recibieron tratamientos diferentes. La primera alícuota recibió un tratamiento externo con RNAsa. La segunda consistió en una muestra de OMVs lisadas y posteriormente tratadas con RNAsa. Por último, la tercera alícuota fue utilizada como control y no recibió ningún tratamiento. Para la degradación del RNA externo se realizó un tratamiento con RNAsa a una concentración de 10 ng/ $\mu$ L durante 30 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, las OMVs fueron diluidas 1/100 y vueltas a centrifugar para eliminar el enzima. Para la



preparación de muestras lisadas, las muestras de OMVs recibieron un tratamiento externo con RNAsa y fueron lavadas para eliminar los restos del enzima. El pellet de vesículas fue sometido a un tratamiento de lisis con Triton X-100 al 0,2% durante 30 minutos, para volver a ser sometidas a un segundo tratamiento con RNAsa. A continuación, se determinó la concentración de OMVs de cada muestra por el método de Purpald y se extrajo el RNA total de una cantidad de OMVs correspondiente a 80 µg de LPS, empleando el kit comercial *miRNeasy Kit* (Qiagen). La cantidad de RNA obtenida de cada muestra fue determinada mediante fluorimetría *Qubit RNA Assay Kit* (Life Technologies) y RT-PCR. Cambios en los perfiles electroforéticos fueron estudiados mediante chips de *pico-RNA 6000* Agilent Bioanalyzer. El experimento fue realizado tres veces, con dos replicas técnicas en cada experimento y para comprobar si había diferencias estadísticas se realizó un ensayo de t-Student (p-valor < 0,05).

## **15. SECUENCIACIÓN MASSIVA DE sRNA PROCEDENTE DE OMVs Y CÉLULAS DE *P. aeruginosa* PAO1 (RNA-SEQ)**

### **15.1 PREPARACIÓN DE LAS LIBRERÍAS**

Las librerías de sRNAs fueron preparadas con el kit *NEBNext® Small RNA Library Prep Set for Illumina®* (New England Biolabs, NEB), que permiten realizar la secuenciación de sRNAs a partir de cantidades comprendidas entre los 100 ng y 1 µg de RNA total, sin la necesidad de eliminar el RNA ribosómico. Para la preparación de la librería de RNA bacteriano se partió de 1 µg de RNA tratado con DNasa TURBO DNA-free™, a continuación, las librerías fueron preparadas y los fragmentos menores fueron separados y seleccionados mediante su purificación a partir de gel de poliacrilamida y posteriormente secuenciados.

Las librerías de RNA de OMVs se prepararon utilizando el volumen total de elución de la extracción del RNA realizada a partir de 70 µg de LPS (30 µL). Debido a que la concentración de RNA en OMVs es muy baja, la muestra se concentró hasta un volumen de 5 µL con *SpeedVac vacuum concentrators* (Thermo Fisher), ya que el volumen que se requiere para la preparación de la librería está comprendido entre 1–6 µL. Como la mayor parte del RNA no se corresponde con rRNA y la concentración de RNA de la muestra es muy baja, se decidió no realizar el paso de purificación de los fragmentos <200 nt con geles de poliacrilamida. Además, tampoco se trató el RNA vesicular con DNasa, por dos motivos. En primer lugar, los adaptadores de la librería tan solo se unen a ácidos nucleicos

monocatenarios y en segundo lugar, las sales añadidas durante el tratamiento con DNAsa, al ser concentradas, interfieren en la generación de la librería (resultado no mostrado).

La preparación de todas las librerías fue realizada por la unidad de genómica del Centro de Regulación Genómica (CRG) y fueron secuenciadas en *paired-end* mediante HiSeq 2500 System (Illumina) generando fragmentos de 50 o 75 pb (2x50//2x75pb).

### 15.2 BIOINFORMÁTICA DEL PROCESO DE RNA-SEQ

Una vez las librerías fueron secuenciadas, se inició el tratamiento bioinformático de las mismas. Este fue realizado por la unidad de bioinformática del hospital Vall d'Hebrón tal como se detalla a continuación. Como se realizó una secuenciación tanto del extremo 3' como del 5' del transcrito de RNA, en primer lugar, se procedió a la unión de ambos extremos mediante el programa, *FastQ Joiner v2.0.1*. disponible en el servidor de Galaxy (<https://usegalaxy.org>). Seguidamente se procedió a realizar los controles de calidad de los ficheros con el programa *FastQC v0.69* y se eliminaron los adaptadores con el programa *Trimmomatic v0.36.3*. A continuación, las secuencias fueron mapeadas contra el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (*Pseudomonas\_aeruginosa\_pao1*. ASM676v1.37) mediante el uso del *Bowtie v1.1.2* y por último se contaron el número de “reads” por gen mediante *Htseq-count v0.6.1* también incorporado en el propio Galaxy. Finalmente, el análisis de la expresión diferencial se realizó tal como describe (Love et al., 2014) con *DESeq2 v.2.11.39* para normalizar y determinar las diferencias mediante el cálculo del “fold change” entre los dos grupos de muestras (Bacteria vs OMVs). El test empleado para determinar la significación estadística de las diferencias detectadas para cada elemento fue el test de Wald (t-Wald), y estos fueron corregidos respecto al global de la muestra mediante el test de Benjamini-Hochberg obteniendo los valores de FDR o p-valor ajustado.

### 16. ESTABILIDAD DEL RNA ENCAPSULADO EN EL INTERIOR DE LAS OMVs

Las OMVs fueron aisladas y tratadas externamente con el enzima RNAsa tal como se describe en los apartados anteriores. De la muestra aislada de OMVs se realizaron alícuotas de 20 µL (60 µg of LPS) y fueron diluidas con TSB 2X hasta un volumen de 40 µL. Las alícuotas fueron incubadas durante 2 h, 4 h, 6 h, y 24 h en eppendorfs de 1,5 mL RNase/DNase-free e inmediatamente después de la finalización de cada tiempo, se procedió al aislamiento del RNA de cada muestra. Posteriormente, se realizó la RT-qPCR

de CrcZ, con el fin de cuantificar la posible degradación de RNA en vesículas. Como control, una de las alícuotas de vesículas aisladas (20  $\mu$ L) recibió un tratamiento de lisis y fue incubada durante 6 horas a 37°C. El experimento se realizó por triplicado y con dos replicas técnicas para cada tiempo.

### **17. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE VESICULACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE ALTA RESOLUCIÓN EN SOBRENADANTES DE *P. aeruginosa* PAO1**

Con la finalidad de cuantificar el número de OMVs directamente de sobrenadantes bacterianos mediante citometría de alta resolución, se adaptó el método descrito en el apartado 3.3 de cuantificación de OMVs mediante citometría de flujo con algunas modificaciones.

En primer lugar, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 se cultivó en matraces muescados de 2 L con 500 mL de TSB irradiado, en un agitador orbital a 115 rpm y a una temperatura de 37°C. Cada 30 minutos, se cogieron alícuotas de 7,5 mL para medir: la densidad óptica (DO) a 600 nm, el número de bacterias en cultivo mediante el método recuento en placa, la concentración relativa de piocianina y el número de OMVs.

Para el recuento de OMVs directamente de los sobrenadantes de cultivo mediante citometría de alta resolución, 2 mL de cultivo fueron centrifugados a 15.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue filtrado por un filtro de jeringa 0,2  $\mu$ m, 13 mm de diámetro y membrana de PES (Puradisc™, Millipore) y guardado en eppendorfs, a 4°C para ser procesados el día siguiente.

Para la cuantificación, los sobrenadantes fueron teñidos con el fluoróforo FM4-64 (Life Technologies) a una concentración final de 0,5  $\mu$ g/mL e incubados durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, fueron analizados inmediatamente con el citómetro BD FACS Aria™ Fusion III (BD Bioscience). Las muestras fueron diluidas con TSB filtrado por 0,2  $\mu$ m hasta conseguir una frecuencia de eventos < 10.000 eventos/s empleando la velocidad de flujo menor que permite el instrumento (Flow rate = 2). Los tiempos de adquisición fueron de 1 minuto y se registraron durante 30 segundos. El número de partículas/mL fue determinado mediante el uso de un patrón de esferas fluorescentes con un tamaño de 100 nm (Fluorospheres, Life technologies). El blanco del instrumento fue establecido mediante el análisis de TSB filtrado añadiendo FM4-64 y se ajustó hasta conseguir una frecuencia de eventos <

20 eventos/s. Para calcular la tasa de vesiculación de cada punto, el número de partículas fue normalizado respecto al número de unidades formadoras de colonias por mililitro (ucf/mL) de cada punto.

El experimento fue repetido 5 veces, con dos replicas por experimento. Se realizó una comparación múltiple mediante ANOVA y el procedimiento LSD de Fisher para la comparación de las medias entre ellas (p-valor < 0,01). Previamente, se realizó el test de Levene confirmando que las varianzas de las medias obtenidas para cada punto eran iguales (p-valor < 0,05).

#### **18. EXTRACCIÓN DE LA PIOCIANINA DE LOS SOBRENADANTES DE *P. aeruginosa* PAO1**

La piocianina secretada y acumulada en los sobrenadantes bacterianos fue extraída mediante el método descrito por Essar & Eberly, 1990. Para ello, a 5 mL de sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1 sin células se añadieron 3 mL de cloroformo y se agitó. Se recogió la fase orgánica en un nuevo tubo y se añadió 1 mL de HCl 0,2 N. La muestra se volvió a agitar y se recogió la fase acuosa. La cantidad de piocianina fue medida a una DO de 520 nm en un espectrofotómetro y la concentración fue determinada multiplicando la DO x 17,072.

#### **19. RECuento BACTERIANO POR EL METODO DE DILUCIÓN Y SIEMBRA EN SUPERFICIE**

La determinación del número de células presentes en una muestra se calculó mediante el método de dilución y recuento de en placa, lo cual permite determinar el número de células cultivables presentes en el medio de cultivo en un momento determinado (Harrigan & McCance, 1966). El valor se expresa como unidades formadoras de colonias por mL (ucf/mL).

#### **20. TRANSFERENCIA DE sRNAs MEDIANTE OMVs**

##### **20.1 PLÁSMIDOS Y PRIMERS UTILIZADOS**

El listado de plásmidos y cebadores empleados durante esta parte del trabajo experimental se recogen en las Tablas 3.6 y 3.7.

Tabla 3.6. Lista de plásmidos y referencias.

Plásmidos		
Nombre	Descripción	Fuente
pKH6	Utilizado para clonar <i>crcZ</i> bajo el control de un promotor inducible para Arabinosa. (GmR)	(Han, Tjaden, & Lory, 2016)
pXG-10	Utilizado para clonar región promotora de <i>amiE</i> (286 pb) y construir la fusión traduccional <i>amiE::sf-GFP</i> que contiene los primeros 7 aa de la proteína. (CmR)	(Urban & Vogel, 2007)
pBBR1MCS	Vector de expresión del constructo <i>amiE::sf-GFP</i> . (CmR)	(Kovach et al., 1995)
pME3859	pME6010 con la región promotora de 194-bp de <i>HcnA</i> y la fusión traduccional <i>hcn::lacZ</i> con los primeros 7 aa de la proteína (TetR)	(Pessi et al., 2001)

Tabla 3.7. Lista de cebadores empleados para el clonaje de las fusiones traduccionales.

Cebadores de clonaje	secuencia (5' → 3')
J85_crcZoexrev_PstI	TTTTTTTCTGCAGAAAAACGGGGAAAAACGGAGGGAGGG
N136_crcZoexfw_EcoRI	TTTTTTTGAATTCGCACAACAACAATAACAAGCAAC
S132_NsiI_amiE_fw	TTTTTTATGCATGGCTGCATGCTATCTCAGGCGC
T132_amiE_NheI_rev	TTTTTTGCTAGCGGAAATATCGCCGTGACGCAT
z132_amiE:gfp_sf_ClaI	GTTTTATCGATAGAGATTGACATCCCTATCAGTG
V132_sfGFP_XbaI_rev	TGATTCTAGATTATTTGTAGAGCTC
M6_spfGFP_PstI	TTTTCTGCAGTCTGGCGAATTCATGAGCAA
N6_sfGFP_ClaI	GTTTTATCGATCTAGATTATTTGTAGAGCTC

## 20.2 TÉCNICAS MOLECULARES

Si no se indica lo contrario, en las técnicas moleculares se emplearon los siguientes reactivos, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

### 20.2.1 Obtención de DNA genómico y plasmídico.

Para la obtención del DNA genómico de *Pseudomonas aeruginosa*, se ha utilizado el kit comercial *GeneJET Genomic DNA Purification kit* (Thermo Scientific™), partiendo de un 1 mL de cultivo de la cepa de interés crecida hasta la fase estacionaria.

Para la obtención del DNA plasmídico, se empleó el kit comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific™). La obtención del DNA plasmídico fue efectuada

partiendo de 20 mL de cultivo en fase estacionaria y empleando el doble del volumen recomendado en la resuspensión de las células, la lisis y la neutralización.

#### **20.2.2 Amplificación del DNA para su clonaje.**

La amplificación del DNA para su posterior clonación en el plásmido, se realizó con la mastermix *MyFi™ Mix* (Bioline), que está compuesta por una DNA polimerasa de alta fidelidad. Las condiciones de la PCR se realizaron según lo establecido en el protocolo y empleando una temperatura de alineación de los cebadores de 60°C.

#### **20.2.3 Purificación del DNA.**

La purificación de los fragmentos de DNA se realizó con el kit comercial *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Life Science) que permite la purificación de fragmentos de DNA de hasta 20 kb.

#### **20.2.4 Digestión enzimática del DNA.**

Las digestiones enzimáticas se realizaron con los enzimas de restricción *FastDigest* (Thermo Scientific™) tal como indican los protocolos para cada enzima y empleando un volumen de reacción de 50 µL. Para la digestión de fragmentos de DNA procedentes de una amplificación por PCR se emplearon 15 µL de DNA purificado y en un volumen final de reacción de 50 µL. Para la digestión de DNA plasmídico se emplearon entre 1- 2 µg de DNA. Con el fin de evitar la recircularización del plásmido durante la ligación, éste fue tratado con *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Thermo Scientific™) durante su digestión. A continuación, el DNA digerido fue purificado para la reacción de ligación.

#### **20.2.5 Ligación de fragmentos de DNA.**

La ligación del DNA fue realizada empleando el *T4 DNA Ligase kit* (Thermo Scientific™). En cada ligación se añadieron 100 ng de DNA plasmídico y el fragmento se añadió a una proporción 1:6 (plásmido:fragmento). La incubación se realizó a 16°C durante toda la noche.

#### **20.2.6 Transformación y selección de clones.**

El objetivo de la transformación de las células competentes es la internalización de DNA circular exógeno por la célula bacteriana. Para la preparación de las células de *Escherichia coli* DH5α para ser transformadas mediante choque térmico, éstas se

cultivaron durante 3 horas en 50 mL de TSB hasta una DO de 0,5. A continuación, las células fueron centrifugadas y el pellet fue resuspendido en 25 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1M a 4°C. Seguidamente, se realizaron dos lavados con CaCl<sub>2</sub> 0,1M a 4°C reduciendo el volumen a la mitad en cada centrifugación. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 1,5 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1M y se añadió glicerol hasta una concentración final del 20%. Las suspensiones bacterianas fueron conservadas a -80°C en alícuotas de 100 µL hasta el momento de su utilización.

Para la transformación de las células por choque térmico se añadieron 50 ng de DNA a 100 µL de células competentes, dejando incubar la mezcla durante 15 minutos en hielo. Seguidamente se realizó el choque térmico a 42°C durante un tiempo máximo de 2 minutos. A continuación, se añadieron 900 µL de LB y se dejaron incubar durante 3 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se cultivaron las bacterias en placas con antibióticos y se incubaron durante 24 horas. En la transformación se emplearon mínimo 3 controles. El primero, la cepa sin DNA exógeno. El segundo control fue añadir a las células transformantes el plásmido linealizado sin fragmento de PCR. Por último, se añadió el plásmido circular sin digerir.

Para la selección de clones se diseñaron cebadores fuera del “*multicloning site*” (MCS) del plásmido. El fragmento fue amplificado mediante PCR y se valoró la inclusión del fragmento mediante geles de agarosa, comparando el producto de amplificación del constructo con el producto de amplificación obtenido del plásmido original. Una vez los clones fueron seleccionados, se obtuvo el plásmido tal como se describe en el apartado 20.2.1. A continuación, el MCS del plásmido fue secuenciado mediante el servicio EZ-seq ofrecido por Macrogen Inc.

#### **20.2.7 Preparación de células electrocompetentes de *Pseudomonas aeruginosa* y Electroporación.**

Para la preparación de células electrocompetentes de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 o sus mutantes, éstas se incubaron en 20 mL de LB a 42°C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las células y se resuspendieron en una solución de Glicerol al 15% / MOPS 1mM guardado a 4°C. A continuación, se realizaron 2 lavados de las células con el tampón, y por último, se resuspendieron a dilución 1/10 del volumen inicial y se guardaron en alícuotas de 100 µL a -80°C.

Para la electroporación, se depositaron las células electrocompetentes en cubetas de electroporación y fueron electroporadas mediante un tratamiento de 2,5V con el aparato *E. coli Pulser™ Transformation Apparatus* (Bio-rad). A continuación, las células se resuspendieron en 900  $\mu$ L de LB e incubaron durante 3 horas. Pasado este tiempo las células fueron sembradas en placas de TSA con antibióticos.

### 20.3. CONSTRUCCIÓN DE LAS FUSIONES TRADUCCIONALES

#### 20.3.1 Construcción de la fusiones traduccionales *amiE::sf-GFP*.

Para la construcción de la fusión traduccional *amiE::sf-GFP*, la región promotora del operón *ami* y la secuencia que codifica los primeros siete aminoácidos de *amiE* se amplificaron con los cebadores S132 y T132, usando como DNA molde el DNA cromosómico obtenido de *Pseudomonas* PAO1. El fragmento fue digerido con NsiI y NheI y se clonó en los sitios correspondientes de pXG-10.

El plásmido pXG-10 tiene un origen de replicación para *E. coli*. Por tanto, la construcción traduccional *amiE::sf-GFP* se amplificó con los cebadores z132 / v132. Después de la digestión con ClaI / XbaI, el fragmento se insertó en el plásmido de expresión pBBR-MCS1, obteniendo el plásmido pCC1. La expresión de *amiE* se indució con acetamida a una concentración final de 40 mM.

#### 20.3.2 Contrucción de la fusión traduccional *hcnA::sf-GFP*.

Para la obtención del constructo reportero se empleó el plásmido previamente descrito por Pessi y colaboradores (2001), el cual contiene la secuencia que codifica para los primeros 9 aminoácidos de la proteína implicada en la síntesis del cianuro de hidrógeno (HCN) y cuya expresión a nivel de mRNA está bajo el control del promotor constitutivo pTAC. Así pues, para la construcción de la fusión traduccional *hcnA::sf-GFP* se amplificó la *sf-GFP* a partir de pXG-10 con los cebadores M6/N6. A continuación, el fragmento y el plásmido PME3843 fueron digeridos con los enzimas PstI y ClaI y finalmente, se juntaron mediante una reacción de ligación. El plásmido resultante se denominó pCC2 (Fig 3.2).



Figura 3.1. Esquema de la fusión traduccional *hcnA::sf-GFP*.



### 20.4 CLONAJE DE *CrcZ* BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR pBAD

Con el fin de sobreexpresar *CrcZ* en las vesículas, se empleó el plásmido pKH6 que contiene un promotor inducible para arabinosa (Han et al., 2016). El control realizado por pBAD de los genes es muy preciso y no presenta fenómenos de expresión del transcrito sin la presencia del inductor. Para la construcción del plásmido se amplificó el gen *crcZ* a partir del DNA molde de PAO1, utilizando los oligonucleótidos (17F\_EcoRI\_ *crcZ* / 17R\_PstI\_ *crcZ*). Este fue insertado en el plásmido pKH6 entre las dianas de restricción EcoRI y PstI, obteniendo el plásmido pCC3.

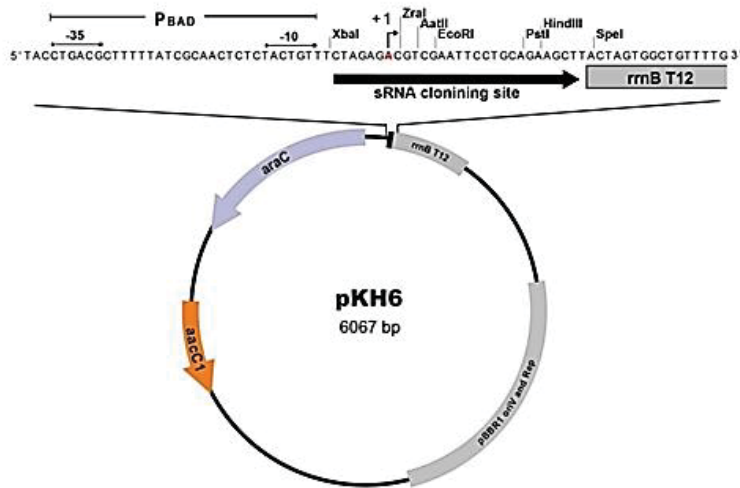


Figura 3.2. Esquema del plásmido pKH6 empleado para la expresión de *CrcZ* (Fuente Han et al., 2016).

### 20.5 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE LAS FUSIONES TRADUCCIONALES

Para comprobar la sensibilidad del constructo, la cepa de PAO1  $\Delta$ *crcZ* transformada con los plásmidos pCC1 and pCC3 fue cultivada en tubos con 5 mL de LB e inoculados al 0,5% con un cultivo overnight. Los cultivos fueron incubados durante 1 hora en agitación (165 rpm) y en presencia de acetamida 40 mM para estimular la síntesis del mRNA *amiE*. Pasado este tiempo se indujeron los cultivos con las concentraciones correspondientes de L-arabinosa (0,0002% - 0,0008% - 0,0016% - 0,005 % - 0,02%). La síntesis de *sf*-GFP

se monitorizó mediante la determinación de la fluorescencia (Ex515/Em585) a las 1, 2, 4 y 6 horas en el lector de placas SYNERGY HT (BioTek Instruments, Inc.). Las lecturas de fluorescencia fueron normalizadas a la DO (600 nm).

#### **20.6 ESTUDIO DE LA INTERNALIZACIÓN DE CrcZ EN OMVs TRAS LA SOBREENPRESIÓN DE CrcZ EN LAS CÉLULAS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Con la finalidad de estudiar si la sobreexpresión de CrcZ en las células conllevaba a una mayor secreción del sRNA incluido en vesículas, se cultivó la cepa en matraces de TSB irradiado suplementado con acetamida 40 mM. Los matraces se inocularon al 0,5% con un preinoculo o/n de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 transformada con el plásmido pCC1 + pCC3. A tiempo cero, se añadió una concentración final de L-arabinosa de 0,15% (la concentración máxima de inducción es del 0,15%) y se hizo un seguimiento de la síntesis de *sf*-GFP mediante la determinación de la fluorescencia y los datos fueron normalizados respecto a la DO (600 nm). También se añadió una réplica sin inducción con arabinosa.

Una vez establecido el tiempo adecuado de inducción (2 horas), se procedió a aislar OMVs de *P. aeruginosa* PAO1 salvaje con el plásmido pCC3, en condiciones de inducción y sin inducir. Para ello, se incubaron 4 matraces con 500 mL de TSB irradiado y se inocularon al 1% con un preinoculo o/n de la cepa *P. aeruginosa* PAO1\_pCC3. A una DO~1, dos matraces fueron inducidos con L-arabinosa a una concentración final de 0,15% mientras que los dos restantes fueron empleados como control. Los matraces se cultivaron durante un máximo de 2 horas hasta una DO de 1,7 y en este punto se extrajo una muestra de cultivo de cada matraz y se separó en dos alícuotas para la extracción del RNA de las bacterias. El resto del cultivo de cada matraz fue procesado siguiendo el protocolo de aislamiento de OMVs.

Una vez las vesículas estuvieron aisladas se trataron externamente con RNAsa y se lavaron con agua. A continuación, se calculó el LPS y se extrajo el RNA procedente de 30 µg de LPS. Posteriormente, las muestras se trataron con DNAsa y se realizó la cuantificación por RT-qPCR de CrcZ de las muestras de RNA vesicular y RNA bacteriano.

## 20.7 ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA DE CrcZ EN OMVs

### 20.7.1 Determinación de la transferencia con CrcZ en tubos.

Para la determinación de la transferencia de CrcZ en tubos, se siguió el protocolo empleado por Tran & Boedicker (2017) utilizado para determinar la transferencia de plásmidos mediante OMVs.

Para la realización del experimento en primer lugar se obtuvieron OMVs de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 salvaje y de *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ crcZ. Ambas cepas, fueron transformadas previamente con el plásmido pKH6 que confiere resistencia a gentamicina, para poder detectar la transferencia del plásmido como control de la captación de OMVs por parte de la cepa receptora. Las OMVs de ambas bacterias fueron obtenidas a partir de un 1L de cultivo de TSB irradiado incubado hasta una DO de 1,7. Las OMVs una vez aisladas, se trataron externamente con RNAsa, se calculó la proteína y se guardaron en nevera un máximo de 3 días.

Para la preparación de las células receptoras, se cultivaron las cepas *P. aeruginosa* PAO1 salvaje y *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ crcZ transformadas con el plásmido pCC1 (*amiE::sf-GFP*) en matraces de 150 mL con 40 mL de medio suplementado con acetamida a 40 mM. A una DO de 0,2, las células fueron repartidas en tubos de vidrio con 4 mL del cultivo. A continuación, a cada tubo se añadieron OMVs (12  $\mu$ g de proteína = 6,6  $\mu$ L) y se cultivaron a 37°C en agitación. A cada hora se tomaron muestras para calcular la DO y la fluorescencia derivada de la síntesis de la GFP. El experimento fue realizado en dos ensayos independientes, con dos réplicas para cada punto. Finalmente, pasadas 18 horas se sembraron dos alícuotas de cada tubo de 200  $\mu$ L en placas de agar con gentamicina para detectar la presencia del plásmido pKH6 en las células receptoras.

### 20.7.2 Determinación de la transferencia de OMVs en microplacas.

Se decidió incubar la bacteria en presencia de distintas proporciones de OMVs por célula, concretamente de 100:1, 10:1 y de 1:1. Para determinar el número de OMVs en la suspensión se decidió extrapolar la concentración de LPS a los datos obtenidos en las cuantificaciones de OMVs explicados anteriormente en el apartado de Materiales y Métodos. A cada pocillo, se añadieron 3  $\mu$ L de una concentración estimada de  $10^{10}$  OMVs/mL. En cada pocillo, se añadieron 100  $\mu$ L de una suspensión de bacterias de  $1 \times 10^8$  ucf/mL ( $10^7$  ucf) o de  $1 \times 10^7$  ucf/mL ( $10^6$  ucf). Las cepas ensayadas fueron tanto *P.*

*aeruginosa* PAO1 como *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *crcZ* transformadas con el plásmido pCC1. Todos los cultivos se realizaron en LB y se suplementaron con acetamida. Las OMVs empleadas se obtuvieron de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 transformada con el plásmido pKH6. Las OMVs fueron tratadas externamente con RNAsa y lavadas para eliminar el exceso de enzima.

La disposición de las muestras en la placa se detalla en la Figura 3.3. Las placas, una vez preparadas se cultivaron a 37°C sin agitación dentro del lector de placas SYNERGY HT (Biotek Instruments, Inc), y se monitorizó la fluorescencia y la DO de las muestras cada hora. Como control se añadieron OMVs lisadas mediante diferentes ciclos de congelación y descongelación (-80°C y +80°C). El experimento fue realizado por duplicado con dos producciones distintas de OMVs.

		3 $\mu$ L OMVs		1/10 OMVs		3 $\mu$ L OMVs lisadas		1/10 OMVs lisadas		3 $\mu$ L OMVs*		control			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
I	A	PAO1 10 <sup>7</sup>		1:10		1:1		1:10		1:1		1:10		1:1	
	B	PAO1 10 <sup>6</sup>		1:100		1:10		1:100		1:10		1:100		1:10	
	C	$\Delta$ <i>crcZ</i> 10 <sup>7</sup>		1:10		1:1		1:10		1:1		1:10		1:1	
	D	$\Delta$ <i>crcZ</i> 10 <sup>6</sup>		1:100		1:10		1:100		1:10		1:100		1:10	
II	E	PAO1 10 <sup>7</sup>		1:10		1:1		1:10		1:1		1:10		1:1	
	F	PAO1 10 <sup>6</sup>		1:100		1:10		1:100		1:10		1:100		1:10	
	G	$\Delta$ <i>crcZ</i> 10 <sup>7</sup>		1:10		1:1		1:10		1:1		1:10		1:1	
	H	$\Delta$ <i>crcZ</i> 10 <sup>6</sup>		1:100		1:10		1:100		1:10		1:100		1:10	

Figura 3.3. Diagrama de la siembra de la microplaca para la determinación de la transferencia de *CrcZ* mediada por OMVs. \* En estos pocillos no se añadió acetamida para no inducir la expresión del mRNA *amiE::sf-GFP* y utilizarlo como control de la autofluorescencia de la cepa con OMVs.

### 20.7.3 Valoración mediante citometría de flujo de la transferencia de CrcZ mediada por OMVs.

La determinación de la internalización de CrcZ mediada vesículas se realizó analizando el número de células fluorescentes respecto el total de células analizadas. Para ello, se cultivó *P. aeruginosa*  $\Delta$ crcZ en TSB irradiado hasta una DO de 0,2 ( $10^8$  ucf/mL) y el cultivo fue dividido en alícuotas de 100  $\mu$ l en eppendorfs. A continuación, se añadieron las OMVs en una proporción 100:1 OMVs por célula. Se emplearon OMVs obtenidas tanto de *P. aeruginosa* PAO1 salvaje como de *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ crcZ, utilizando las OMVs de esta última como control negativo de la transferencia. Además, también se cultivó *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ crcZ sin la presencia de OMVs. La fluorescencia fue determinada de forma puntual a las 1, 2 y 4 horas de cultivo. El experimento se realizó por duplicado y con dos réplicas técnicas por cada determinación. Los resultados fueron filtrados mediante FSC frente SSC y se analizaron un total de 25.000 eventos para cada punto.

### 20.7.4 Determinación de la transferencia con CrcZ a partir de sobrenadantes.

Para estudiar la captación de vesículas directamente de sobrenadantes, se cultivaron las cepas *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ crcZ transformadas con el constructo traduccional *amiE::sf-GFP* junto con sobrenadantes extraídos de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta$ crcZ.

Para la preparación de los sobrenadantes, las cepas PAO1 salvaje y PAO1 $\Delta$ crcZ fueron cultivadas en TSB irradiado en matraces de 150 mL con 60 mL de medio, y al alcanzar una DO de 1,6, los cultivos fueron centrifugados y el pellet fue descartado. A continuación, los sobrenadantes de ambas cepas fueron filtrados y alícuotados en fracciones de 4 mL en tubos de vidrio.

Seguidamente estos fueron suplementados con acetamida 40 mM y fueron inoculados con las cepas *P. aeruginosa* PAO1 o *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ crcZ transformadas con el constructo traduccional *amiE::sf-GFP*, añadiendo a cada tubo 40  $\mu$ L de preinóculos con una DO de 0,1. Se dejaron incubar a 300 rpm en un agitador orbital durante 12 horas. A los tiempos de 12, 18 y 22 horas, se tomaron 100  $\mu$ L de muestra y se midió la fluorescencia en el lector de placas SYNERGY HT (Biotek Instruments, Inc.)

Con el fin de confirmar que el incremento en la fluorescencia de los cultivos crecidos con los sobrenadantes obtenidos en el punto de la curva de DO 1,6 era producido por la presencia de OMVs y no por la presencia de algún compuesto soluble secretado por la bacteria directamente al sobrenadante, se procedió a repetir el experimento anterior pero añadiendo dos controles al experimento.

El primer control fue el sobrenadante desprovisto de OMVs y el segundo las OMVs aisladas y resuspendidas en TSB estéril. Para su preparación, los sobrenadantes fueron centrifugados a 40.000 g para separar las OMVs, y una vez eliminadas las OMVs se guardaron en nevera. Las OMVs separadas fueron resuspendidas en el volumen inicial con TSB estéril.

A continuación, las muestras obtenidas de las cepas *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *crcZ* tanto de: (1) sobrenadante, (2) sobrenadante sin OMVs, (3) OMVs resuspendidas en TSB, fueron alicuotadas en 4 mL en tubos de vidrio y fueron inoculadas con las cepas reporteras *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *crcZ* transformadas con el constructo traduccional *amiE::sf-GFP*. Las muestras fueron cultivadas en tubos en un volumen final de 4 mL y se tomaron muestras a las 12, 18 y 22 horas. La fluorescencia fue determinada a partir de 100  $\mu$ L de muestra y ésta se normalizó respecto a la densidad óptica. Se realizó el experimento por duplicado con determinaciones por cada punto.

### **20.8 ENSAYO DE LA CAPTACIÓN DE OMVs POR LA CEPA *Pseudomonas aeruginosa* $\Delta$ *RsmY* $\Delta$ *RsmZ*.**

La internalización de OMVs procedente de la cepa salvaje por la cepa *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *rsmY* $\Delta$ *rsmZ* fue monitorizado con el constructo fluorescente *hcnA::sf-GFP* y la captación de OMVs fue analizada mediante citometría. Así pues, un cultivo o/n de *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta$ *rsmY* $\Delta$ *rsmZ* fue inoculado en medio fresco de TSB irradiado y se cultivó hasta una DO de 0,2. A continuación se dividió el cultivo en alícuotas de 3 mL en tubos de vidrio y se añadieron OMVs en una proporción 100:1 (OMVs/ufc). Como control negativo de la transferencia se emplearon muestras de OMVs lisadas ya que las vesículas presentan cierta autofluorescencia y fueron añadidas en la misma proporción 100:1. También dejamos un tubo al que no se añadieron OMVs como control. Se emplearon dos muestras de OMVs independientes aisladas a una DO de 1,6 en dos días distintos. Se tomó muestra a los tiempos 0, 0,5, 1, 2, 4 horas y fueron guardadas a 4°C hasta su análisis. Los cultivos se mantuvieron en agitación a lo largo del experimento. El

experimento se realizó en 4 experimentos independientes con dos réplicas técnicas cada uno. Para la citometría el número de eventos fueron filtrados mediante FSC frente SSC y un total de 25.000 eventos fueron analizados

## **IV. RESULTADOS**





#### IV. RESULTADOS.

##### **1. CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO TIPO DE VESÍCULAS EN *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup>**

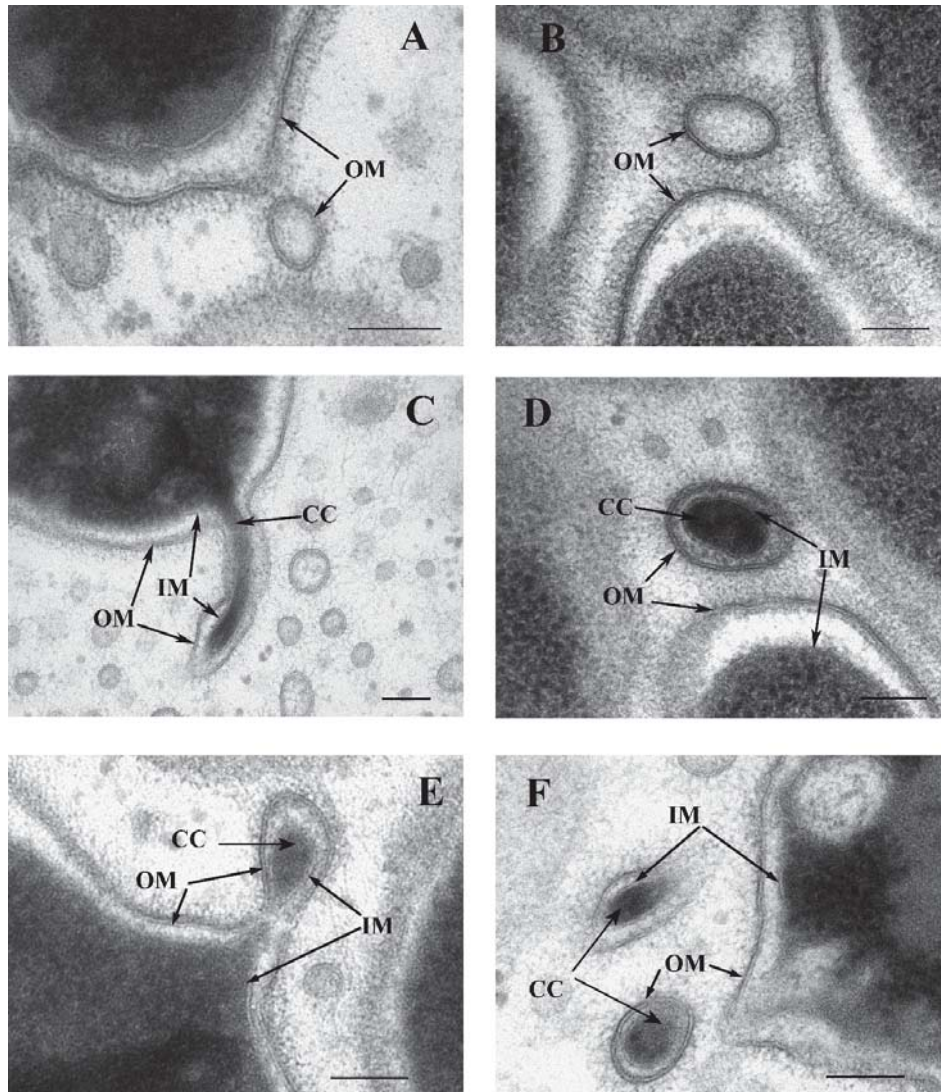
###### **1.1 ESTUDIO ESTRUCTURAL DE *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> MEDIANTE TEM DE CORTES ULTRAFINOS OBTENIDOS DESPUÉS DE HPF-FS**

Los estudios de la primera parte de resultados se han centrado principalmente en la bacteria *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup>. Esta nueva bacteria gramnegativa se aisló a partir de una muestra de un sedimento marino recogido en la isla Decepción, ubicada en las islas Shetland del Sur en la Antártida (Bozal et al. 2009). Con el fin de caracterizar la estructura de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> y el material extracelular que produce, se realizó un estudio mediante TEM de cortes ultrafinos. Para ello, se cultivó la bacteria en TSA a 15°C durante 5 días y las muestras fueron crioinmovilizadas por HPF, criosustituidas, incluidas en resina EPON, seccionadas y contrastadas (ver apartado 4.1.2. de Materiales y Métodos). Las observaciones se llevaron a cabo con el microscopio electrónico Tecnai spirit a 120kV.

Tal como se ha introducido en los objetivos, en estudios iniciales mediante microscopía electrónica se observó que las matrices extracelulares de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> estaban repletas de vesículas de membrana (Frias et al., 2010). Además, se detectó la presencia de dos tipos de OMVs. En primer lugar, se observaron unas OMVs con un diámetro que oscilaba entre los 25 - 200 nm y compuestas por una sola bicapa lipídica que presentaba la misma estructura, diámetro y densidad electrónica (contraste) que la membrana externa de la bacteria (Fig. 4.1, A-B). Por lo tanto, se correspondían con la descripción de las OMVs convencionales que se originan a partir de la OM. Estas vesículas, contenían en su interior un material de baja densidad electrónica que presentaba el mismo aspecto que el contenido del periplasma. Además, la capa más externa de la bicapa lipídica de la OMV estaba recubierta por el mismo material fibroso que rodeaba a la bacteria, tratándose de material capsular y confirmando su origen en la membrana externa bacteriana.

Sorprendentemente, se visualizaron unas vesículas que presentaban una estructura de doble bicapa lipídica con el mismo perfil de tinción que la membrana externa (OM) y la membrana interna (IM). Este tipo de vesículas presentaban un diámetro comprendido entre los 100 - 250 nm y en su interior encapsulaban contenido con una alta densidad

electrónica que coincidía con el material procedente del citoplasma (Fig. 4.1, C-D-E-F). Este tipo singular de vesícula con una doble bicapa, fue observada en diversos de los campos analizados, aunque en mucha menor proporción que las OMVs convencionales anteriormente descritas.



**Figura 4.1.** Imágenes de TEM de cortes ultrafinos de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> después de una criofijación (HPF) y criosustitución (FS). La cepa se cultivó en TSA a 15 °C durante 5 días. Membrana interna (IM), membrana externa (OM) contenido citoplasmático (CC). Barras de 200 nm.

En algunas ocasiones, se pudo capturar el momento justo de la formación de una protuberancia de membrana externa e interna, arrastrando contenido del citoplasma, indicando el posible origen de estas OMVs dobles. Además, se analizaron centenares de células de distintos cortes de la bacteria y se pudo determinar que la formación de este nuevo tipo de vesícula, tenía lugar en células “normales” y que no estaban en fase de división.

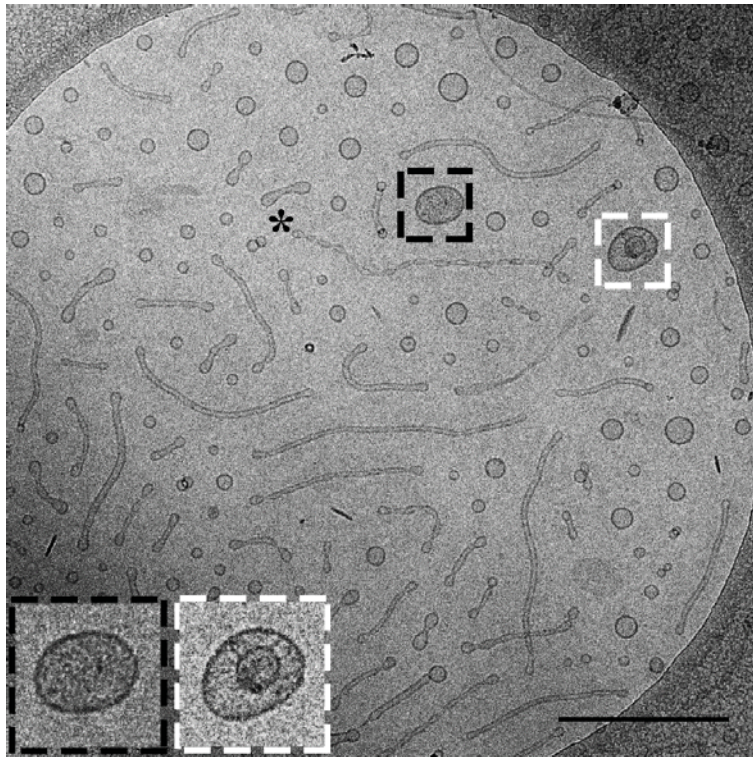
## **1.2 DETERMINACIÓN DE LA PROPORCIÓN DE LAS NUEVAS VESÍCULAS RESPECTO A LAS CONVENCIONALES**

Para confirmar la existencia de estas insólitas OMVs y determinar la frecuencia con la que se liberan, se realizó Cryo-EM de suspensiones de vesículas preparadas con el método de “*Plunge-freezing*” (PF). Para la preparación de la muestra, se obtuvieron vesículas a partir de los sobrenadantes de cultivos líquidos en fase exponencial de crecimiento, con el propósito de evitar la presencia de células lisadas que podrían originar fragmentos de membrana recircularizados, interfiriendo en el resultado. La obtención de las vesículas se llevó a cabo a partir de los sobrenadantes libres de células, mediante una centrifugación a alta velocidad (45.000 g) durante 2h. Estas condiciones permiten la obtención de aquellas vesículas de menor tamaño (~20 nm), tal como se observa en la Figura 4.2.

Se visualizaron ambos tipos de OMVs (Fig. 4.2). Las OMVs convencionales, rodeadas por una sola capa y con un diámetro que variaba entre los 20-200 nm, estaban presentes en mayor abundancia. Mientras que, con menor frecuencia también se visualizaron las OMVs que englobaban en su interior material de elevada densidad electrónica y que presentaban una doble capa supuestamente lipídica de acuerdo a las observaciones previas de TEM (Fig. 4.2, recuadro blanco). No se observaron fragmentos de membranas celulares que indicaran lisis bacteriana. También se observaron la presencia de unas estructuras alargadas, similar a cadenas de vesículas, y que han sido ya descritas en otras cepas de este género (Fig. 4.2, asterisco).

Además de visualizarlas, con el fin de determinar la frecuencia aproximada con que se liberan al medio las nuevas OMVs respecto a las convencionales, se contabilizó la proporción de vesículas de doble bicapa respecto a las OMVs de una sola bicapa presentes en 100 campos a los mismos aumentos que los mostrados en la figura Fig. 4.2. Se contabilizaron alrededor de unas 9000 vesículas, de las cuales sólo el 0,4% correspondieron a OMVs de doble capa. Por tanto, para esta cepa la formación de este

nuevo tipo de OMVs ocurriría con una frecuencia aproximada de 1 de cada  $10^3$  vesículas secretadas al medio en las condiciones de cultivo ensayadas. Debido a que la captura de las imágenes y el recuento de vesículas es manual, para evitar un resultado sesgado se tomaron aleatoriamente imágenes de distintos campos hasta llegar a un número de 100.



**Figura 4.2.** Micrografía obtenida por Cryo-EM de una suspensión vitrificada de OMVs de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>, resuspendidas en 50 mM de HEPES a pH 6.8. Se observan una mayor proporción de OMVs con una sola bicapa. En la imagen se muestra una ampliación de una OMV convencional (recuadro negro), junto a una ampliación de una nueva OMV con doble bicapa (recuadro blanco). Defocus 12.5 $\mu$ m. Barra de 500nm.

### 1.3 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE DNA PRESENTE EN EL INTERIOR DE LAS OMVs.

#### 1.3.1 Cuantificación del DNA asociado a vesículas.

De acuerdo con las imágenes de TEM y Cryo-EM, las OMVs con doble bicapa encapsularían en su interior material procedente del citoplasma, como DNA. Para determinar la cantidad de DNA asociado a OMVs, se realizó una cuantificación antes y después de un tratamiento con DNAsa externo. A continuación, las vesículas fueron lisadas y el contenido de DNA fue evaluado por el ensayo del *Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit*®, que permite una cuantificación selectiva de DNA de doble cadena por fluorimetría.

El DNA se cuantificó a partir tres muestras independientes de vesículas aisladas a partir de cultivos líquidos de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> incubada durante 2 días a 15°C. Posteriormente, las muestras de vesículas fueron divididas en dos alícuotas y una de ellas fue sometida a un tratamiento externo con DNAsa durante 30 minutos. A continuación, el enzima fue inactivado a 80°C y ambas alícuotas fueron lisadas con Triton x-100 al 0,125%. La concentración de DNA fue determinada directamente de las suspensiones de vesículas lisadas, obteniendo unos valores de DNA de  $2,1 \pm 0,4$  ng DNA/  $\mu$ g proteína para muestras no tratadas con DNAsa y unos valores de  $1,8 \pm 0,24$  ng DNA/ $\mu$ g proteína para muestras sometidas al tratamiento externo con DNAsa. Por lo tanto, el 80% del DNA era resistente al tratamiento enzimático, confirmando que para *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> la mayor parte del DNA se halla encapsulado en el interior de vesículas; y no, en el exterior, ya sea libre en espacio extracelular o unido a la superficie externa de las vesículas.

#### 1.3.2 Inmunomarcaje de DNA de cortes ultrafinos de vesículas aisladas de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>.

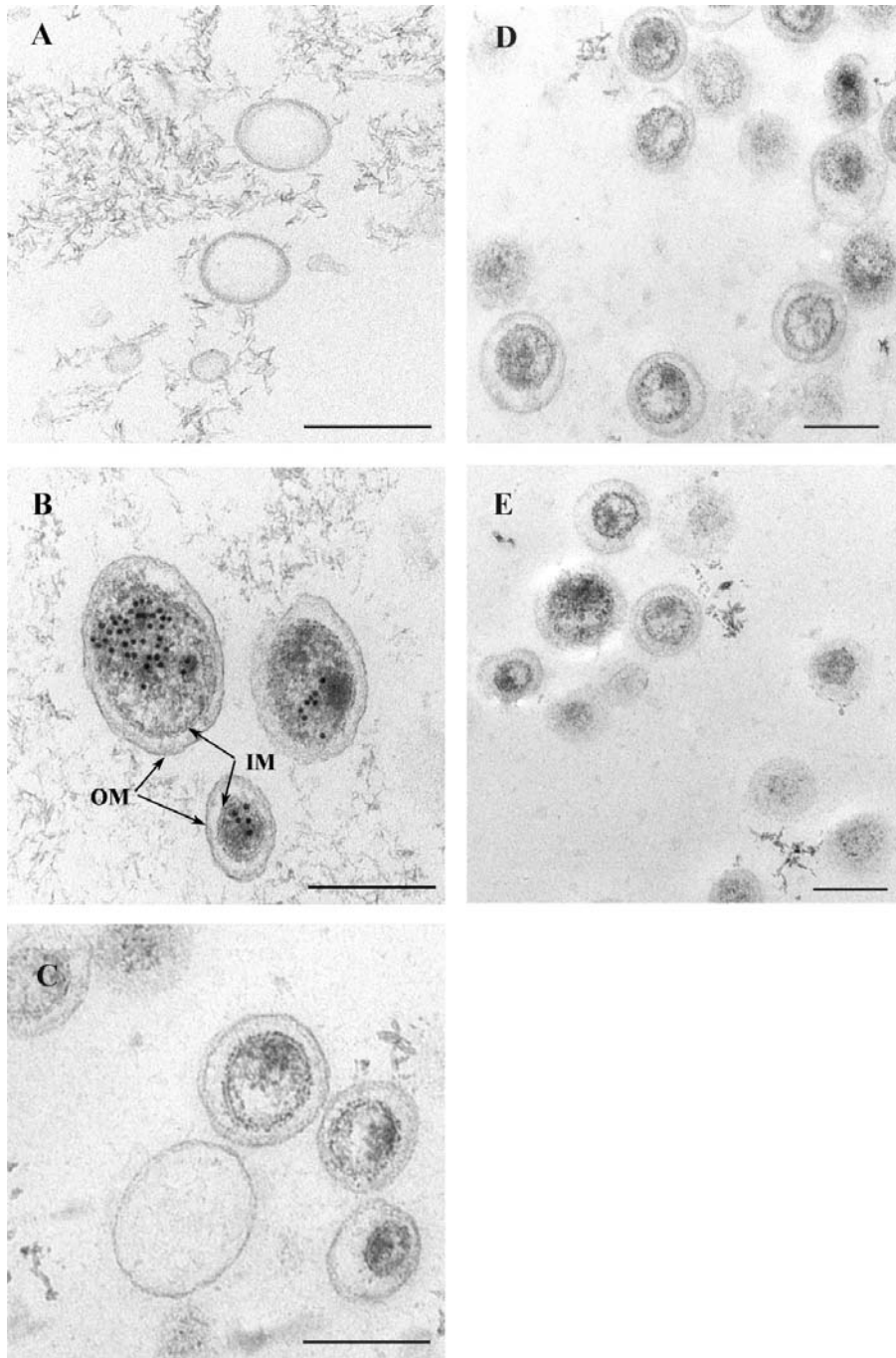
Para confirmar que el DNA detectado en las OMVs después del tratamiento con DNAsa realmente se encontraba encapsulado en su interior y además, evaluar si este material genético estaba contenido en las nuevas OMVs con doble membrana, se realizó un inmunomarcaje sobre cortes ultrafinos de OMVs de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>. Para ello, primeramente, se aislaron las OMVs a partir de cultivos líquidos en fase exponencial y seguidamente se realizó un tratamiento con DNAsa para eliminar DNA del medio. Las muestras fueron procesadas por HPF-FS e inclusión en resina Lowicryl HM20 y se realizaron cortes ultrafinos depositados sobre rejillas de cobre. A continuación, se llevó a

cabo el inmunomarcaje sobre los cortes ultrafinos utilizando un anticuerpo monoclonal específico para DNA de doble cadena (clone AC-30-10; Novus Biologicals, Littleton, CO) y un anticuerpo secundario conjugado con oro (12 nm).

En los cortes ultrafinos de vesículas de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> visualizadas por TEM, se observaron ambos tipos de vesículas: las OMVs convencionales presentes en mayor proporción, formadas por una sola bicapa lipídica y encapsulando un material poco denso a los electrones. En éstas, raramente se observó la presencia de marcaje con partículas de oro (Fig. 4.3, A). Mientras que, en las OMVs de doble bicapa con un material de alta densidad electrónica, se localizaba el marcaje con partículas de oro, confirmando la presencia de DNA en el material electro-denso y reafirmando el origen citoplasmático del material englobado en las OMVs dobles (Fig. 4.3, B). Además, destacaríamos, que no se observó marcaje con oro fuera de las vesículas, primeramente indicando que el tratamiento externo con DNAsa previo a la fijación era efectivo y además, mostrando que al estar el DNA internalizado en vesículas, es resistente a la presencia de enzimas degradativos.

También, se realizaron diversos controles para garantizar que el inmunomarcaje del DNA presente en la muestra era específico. El primer control consistió en omitir el anticuerpo primario con el objetivo de descartar que el anticuerpo secundario tipo IgG se uniera a estructuras de las OMVs produciendo un marcaje inespecífico y efectivamente no se detectó marca de oro en las vesículas (Fig. 4.3, C). En segundo lugar, se realizó el inmunomarcaje utilizando un anticuerpo IgM contra una proteína no presente en *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> y se incubó junto al anticuerpo secundario. Con esta finalidad, utilizamos un anticuerpo tipo IgM contra una proteína de *Plasmodium spp.* y tampoco se observó ninguna marca de oro (Fig 4.3, D). Por último, realizamos un tratamiento con DNAsa de las rejillas para digerir el DNA presente en la muestra y a continuación se realizó el inmunomarcaje con el anticuerpo primario anti-dsDNA y anticuerpo secundario (Fig. 4.3, E). En este caso, se demostró que el enzima degradaba totalmente el DNA presente y no se detectaba marca de oro después de tratamiento.





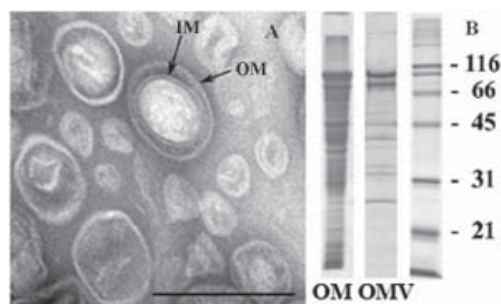
**Figura 4.3.** Imágenes de TEM de OMVs de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> en las que se realizó inmunomarcaje con anticuerpo primario anti dsDNA y anticuerpo secundario marcado con nanopartículas de oro (12nm). (A) OMVs con una sola bicapa en las que no se observa oro. (B) OMVs de doble bicapa con marca de oro en el interior de la bicapa interna. (C) Omisión del anticuerpo primario y sólo adición de anti-IgM (D) Control con anticuerpo inespecífico IgM



contra una proteína de *Plasmodium spp.* + anti-IgM E) Tratamiento previo de las rejillas con 1 mg/ml de DNAsa y 7 mM de MgCl<sub>2</sub>, durante 7 horas e inmunomarcaje. Membrana externa (OM) y membrana interna (IM). Barra de 200 nm.

#### 1.4. PROTEÓMICA DE VESÍCULAS DE MEMBRANA DE *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>.

Se realizaron estudios comparativos de los perfiles proteicos de las OMVs y de la membrana externa de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>, mediante geles SDS-PAGE 1D, tal como realizaron Frías y colaboradores (2010) en un estudio anterior con varias cepas Antárticas. Se pudo apreciar que las proteínas presentes en las OMVs se correspondían principalmente con proteínas de la membrana externa, aunque ciertas fracciones proteicas que estaban enriquecidas en las OMVs, no se encontraron presentes en la misma proporción en la OM o al contrario (Fig. 4.4)



**Figura 4.4. Imagen de tinción negativa de OMVs y perfiles de proteínas.** (A) Imagen obtenida mediante tinción negativa de las OMVs de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> purificadas y observadas por TEM. Podemos observar una OMVs con doble bicapa, que posiblemente se trate de la membrana interna (IM) y de la membrana externa (OM) de la bacteria. Barra de 50 nm. (B) Perfiles proteicos de la membrana externa de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> y de las OMVs purificadas. Los números de la derecha se corresponden con los pesos moleculares en kDa.

Para determinar la localización subcelular de las principales proteínas presentes en OMVs de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>, se partió de un estudio proteómico publicado en la tesis doctoral de Alina Frías (2012) y realizado en el mismo grupo. Para el estudio citado, se procedió a la purificación de las OMVs mediante gradientes de Optiprep® y posterior ultracentrifugación. Seguidamente se separaron las proteínas de las OMVs mediante geles SDS-PAGE 1-D, se cortaron las 17 bandas mayoritarias y se digirieron con tripsina. Los péptidos se separaron mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (CapLC Q-TOF). Las masas individuales de cada péptido fueron comparadas con las bases de datos del NCBI, (NCBI/all y NCBI/Bacteria) con el motor de búsqueda MASCOT. Las proteínas fueron identificadas por similitud con proteínas descritas en

otras especies. Para la localización subcelular de las proteínas identificadas se utilizó el programa PSORTb v 3.0.2 (N. Y. Yu et al., 2010).

Se identificaron un total de 46 proteínas, de las cuales 32 se correspondían con proteínas de la membrana externa, 2 procedían del periplasma, 3 de la membrana interna y 2 procedían citoplasma de la bacteria. Para 6 proteínas no se pudo determinar su localización. Como era de esperar, la mayoría de proteínas procedían de la OM de la bacteria y en gran parte correspondían a receptores TonB y porinas (Tabla 4.1). También se identificaron proteínas procedentes de la membrana interna, como una citocromo C oxidasa y un transportador de nucleósidos. Del citoplasma se identificaron las proteínas F0F1 ATP sintetasa y la subunidad A de la Na<sup>(+)</sup>-translocating NADH-quinona reductasa. Todas las proteínas identificadas y su localización subcelular se encuentran recogidas en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1. Proteínas identificadas en OMVs de *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> con su localización subcelular.**

Anotación proteína	Nº de identificación	de Mowse Score	Coverage (%)	Subcel. Local.	Espécie
TonB-dependent receptor	gi 14563586	181>54	4	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400
TonB-dependent siderophore receptor	gi 14565192	224 > 53	5	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
TonB-dependent siderophore receptor	gi 14565001	174> 53	6	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
TonB-dependent receptor, plug	gi 117921820	99> 53	1	OM	<i>Shewanella</i> sp. ANA-3
TonB-dependent receptor	gi 14565138	92> 53	2	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
TonB-dependent siderophore receptor	gi 120600832	75> 53	2	OM	<i>Shewanella</i> sp. W3-18-1
hypothetical protein Ssed_1693	gi 157374832	69> 53	1	U	<i>Shewanella sediminis</i> HAW-EB3
TonB-dependent receptor	gi 14563794	232> 54	5	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
Hypothetical protein Sfri_2225	gi 14563396	169> 54	9	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
Hypothetical protein Sfri_0573	gi 14561759	74> 54	3	U	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
Phosphate-selective porin O and P	gi 14565185	313> 54	16	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
TonB-dependent receptor	gi 14562015	111>54	3	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
TonB-dependent receptor	gi 294142208	88>54	2	OM	<i>Shewanella violacea</i> DSS12
Putative Zn-dependent aminopeptidase	gi 196158828	68>54	1	U	<i>Alteromonas macleodii</i> "Deep ecotype"
Surface antigen (D15)	gi 14562456	64>54	6	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
Hypothetical protein Sfri_1465	gi 14562642	173>54	10	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
Proteasa DO	gi 14564523	79>54	6	P	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
Porin	gi 157373416	63>54	8	U	<i>Shewanella sediminis</i> HAW-EB3

TonB-dependent siderophore receptor	gi 126176544	131>54	2	OM	<i>Shewanella baltica</i> OS155
Membrane protein involved in aromatic hydrocarbon degradation	gi 114563852	131>54	5	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
Type I secretion outer membrane protein, TolC family protein	gi 212633638	98>54	3	OM	<i>Shewanella livingstonensis</i>
TonB-dependent receptor	gi 114563641	67>54	2	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
Hypothetical porin	gi 219806616	274>53	13	OM	<i>Shewanella livingstonensis</i>
Peptidase M28	gi 114564059	103>53	5	E	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
TonB-dependent siderophore receptor	gi 304412684	147>54	5	OM	<i>Shewanella baltica</i> OS183
OmpA/MotB domain-containing protein	gi 114564063	106>54	2	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
TonB-dependent receptor	gi 114561796	85>52	1	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
Nucleoside transporter	gi 114562178	71>52	5	IM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
Peptidase S9 prolyl oligopeptidase P-C	gi 114563326	63>52	3	P	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
Cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit III CM	gi 114563184	61>52	13	IM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
Porin	gi 114561689	566>54	33	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
TonB-dependent receptor	gi 167623853	171>54	4	OM	<i>Shewanella halifaxensis</i> HAW-EB4
TonB-dependent receptor	gi 170726911	124>54	4	OM	<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908
Outer membrane protein	gi 66275662	85>55	6	OM	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Nucleoside-specific channel-forming protein, Tsx	gi 114562179	85>55	6	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
TonB-dependent heme/hemoglobin receptor family protein	gi 170728329	91>54	3	OM	<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908
Integral membrane protein	gi 21224702	56>54	2	IM	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
OmpA/MotB domain-containing protein	gi 114562640	61>53	12	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400
TonB-dependent heme/hemoglobin receptor family protein	gi 120599996	161>54	4	OM	<i>Shewanella</i> sp. W3-18-1
TonB-dependent receptor, plug	gi 114562004	105>54	2	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400
Type I secretion outer membrane protein, TolC family protein	gi 114561620	184>51	6	OM	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400
Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A	gi 114562127	116>51	7	C	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400
Hypothetical protein	gi 114563395	107>51	4	U	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400

Sfri_2224						
Outer membrane protein A	gi 149773177	70>51	3	OM	<i>Shewanella livingstonensis</i>	
Hypothetical protein	gi 114563792	222>52	19	U	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIM400	
Sfri_2626						
F0F1 ATP synthase subunit beta	gi 114565198	130>52	14	C	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400	

Scores individuales >n indicate identity or extensive homology (p<0.05) OM, membrana externa; IM,, membrana interna; C, citoplasma; P, periplasma; E, extracelular; U, desconocida.

Los resultados obtenidos en este apartado demostraron la existencia de un nuevo tipo de vesículas de membrana en *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> que permite la secreción de contenido del citoplasma, como DNA, mediante la protuberancia de membrana externa e interna, generando unas vesículas con una doble bicapa lipídica, que denominamos debido a su origen, **vesículas de membrana externa e interna** (“*outer inner membrane vesicle*”, **O-IMVs**).

## **2. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL NUEVO TIPO DE VESÍCULAS EN BACTERIAS GRAMNEGATIVAS PATÓGENAS**

Con el fin de determinar si este nuevo tipo de vesículas es exclusivo de una bacteria antártica o bien, su secreción puede ser una característica común entre bacterias gramnegativas, se procedió a estudiar su presencia en tres bacterias patógenas: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Neisseria gonorrhoeae* y *Acinetobacter baumannii* AB41.

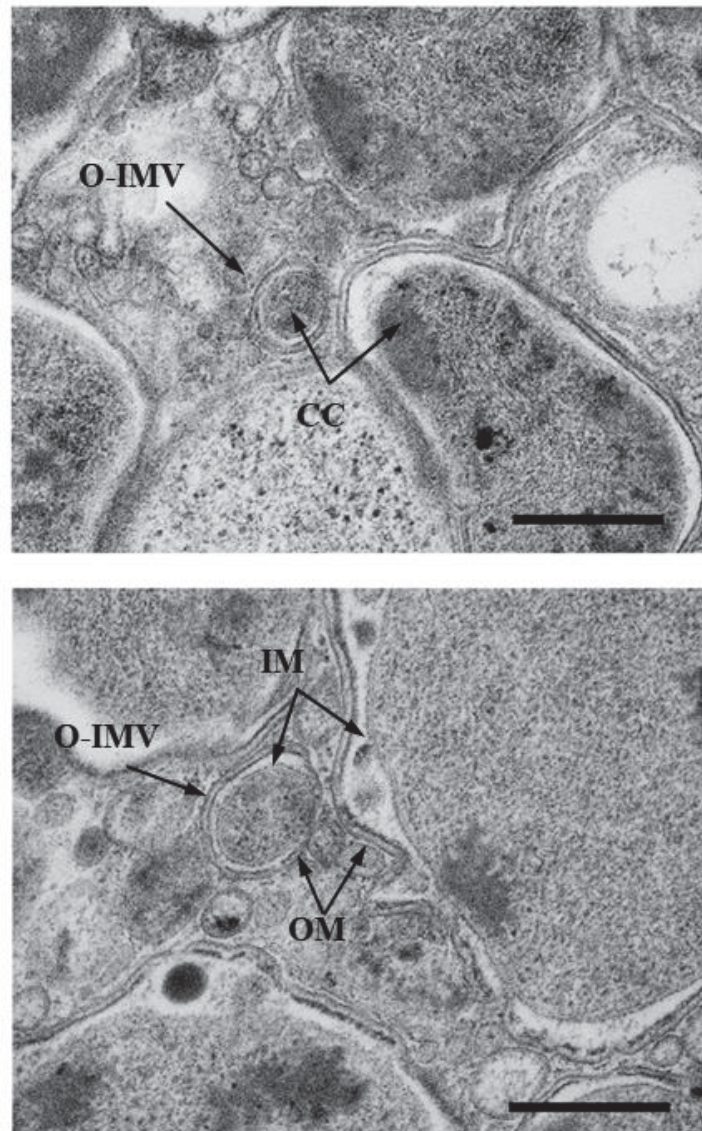
A partir de ahora para evitar confusiones y facilitar la lectura nos referiremos a las vesículas de doble bicapa y que encapsulan material citoplasmático con el término “*outer inner membrane vesicles*” (O-IMVs), mientras que las vesículas convencionales con una bicapa y que encapsulan material del periplasma, las denominaremos OMVs. Para referirnos al conjunto, utilizaremos el término general de vesículas de membrana, MVs.

### **2.1 ESTUDIO ESTRUCTURAL DE TRES CEPAS PATÓGENAS MEDIANTE TEM DE CORTES ULTRAFINOS OBTENIDOS DESPUÉS DE HPF-FS.**

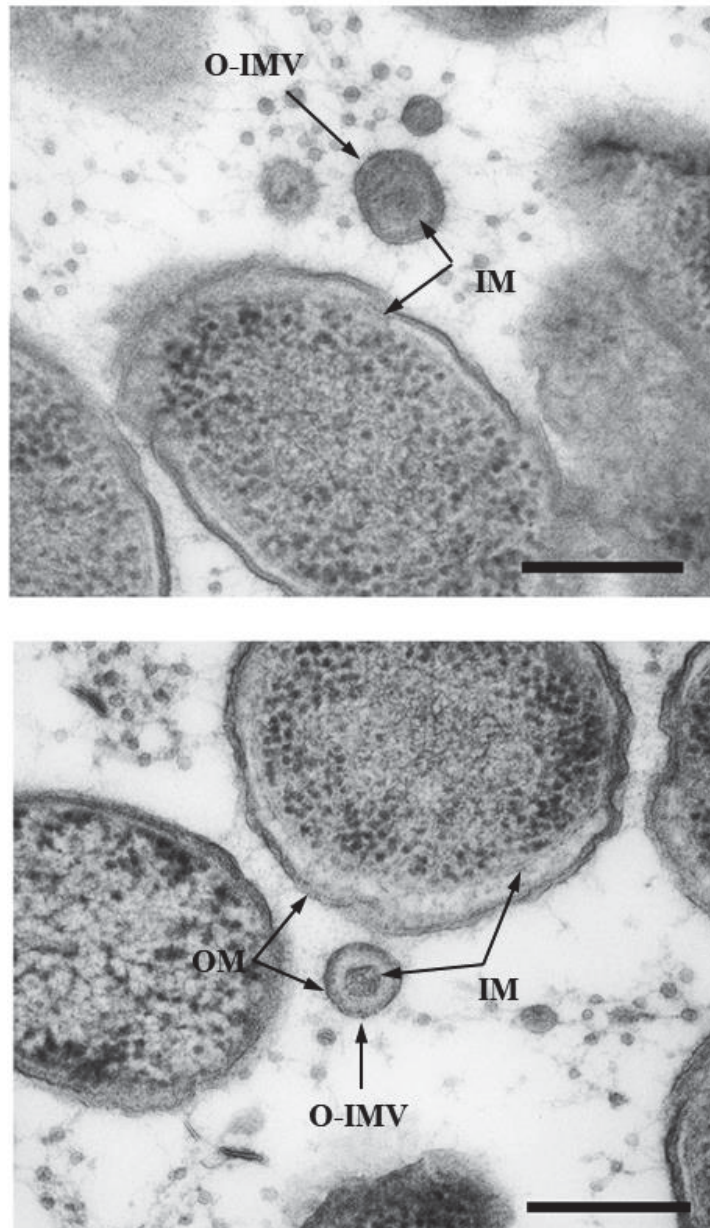
Para detectar las nuevas O-IMVs en bacterias patógenas en las que se ha descrito reiteradamente la presencia de material procedente del citoplasma asociado a ellas, se procedió a realizar la caracterización estructural mediante TEM de cortes ultrafinos de

las tres cepas incluidas en el estudio: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Neisseria gonorrhoeae* y *Acinetobacter baumannii* AB41.

Las observaciones de TEM se realizaron a partir de cortes ultrafinos obtenidos después de HPF-FS de las cepas crecidas en medio sólido. En las tres cepas se observó que las matrices extracelulares estaban repletas de MVs (Fig. 4.5, 4.6, 4.7), siendo más frecuentes las OMVs con una sola bicapa lipídica con la misma estructura, anchura y densidad electrónica que la OM de la bacteria. De la misma manera, pero en muchas menos ocasiones, se observó la presencia de las O-IMVs. Éstas presentaban las mismas características morfológicas que las O-IMVs de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>. Es decir, estaban formadas por una doble bicapa lipídica con material de elevada densidad electrónica en su interior. Además, en algunos casos se pudo apreciar que el material contenido presentaba una apariencia muy similar al contenido citoplasmático con presencia de ribosomas bacterianos (Fig. 4.7).

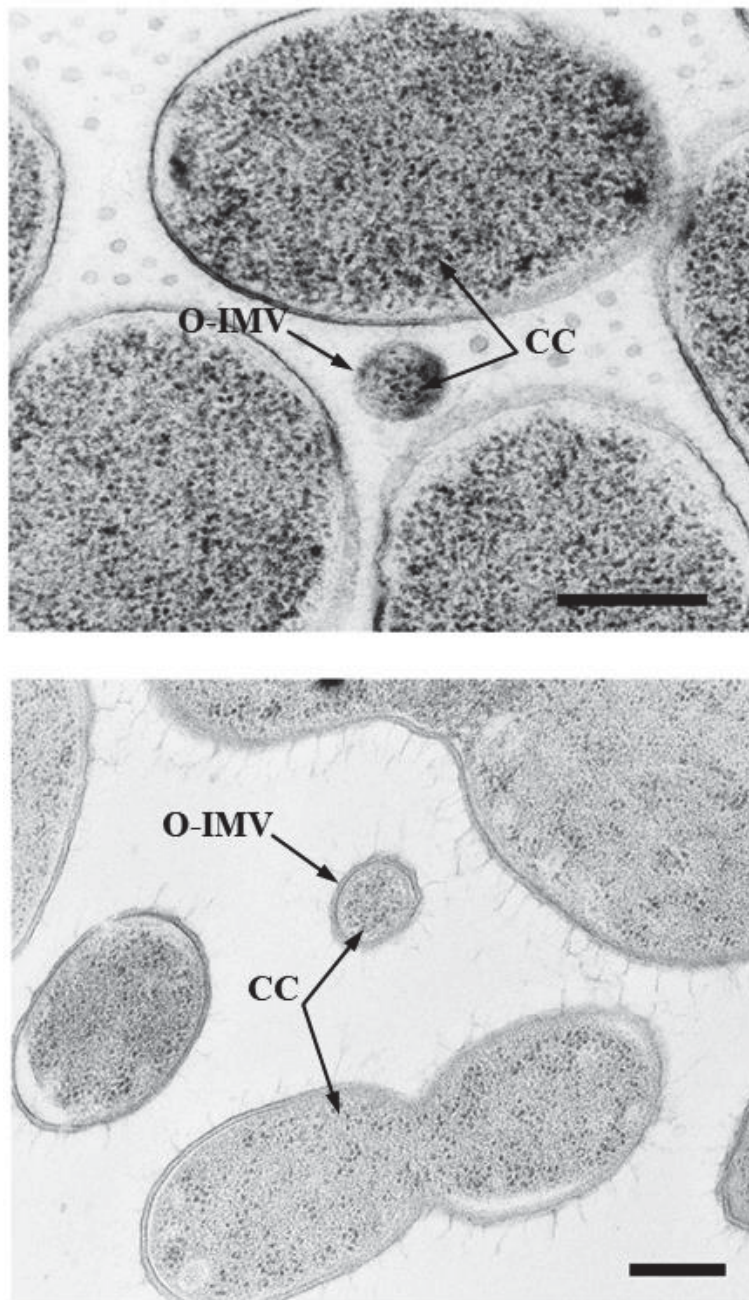


**Figura 4.5.** TEM de cortes ultrafinos de *N. gonorrhoeae* después de HPF-FS. La cepa se cultivó en agar chocolate a 37°C durante 48 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. En ambas imágenes se muestran O-IMVs que presentan la misma estructura de doble bicapa y con el mismo perfil de tinción que las envolturas bacterianas. Membrana externa, OM; membrana interna, IM; contenido del citoplasma, CC. Barras de 200 nm.



**Figura 4.6.** TEM de cortes ultrafinos *Pseudomonas* PAO1 después de HPF-FS. La cepa se cultivo en TSA a 37°C durante 24 horas. En ambas imágenes se muestran O-IMVs que presentan la estructura de doble bicapa con el mismo perfil de tinción que las envueltas bacterianas. Membrana externa, OM; membrana interna, IM; contenido del citoplasma, CC. Barras de 200 nm.

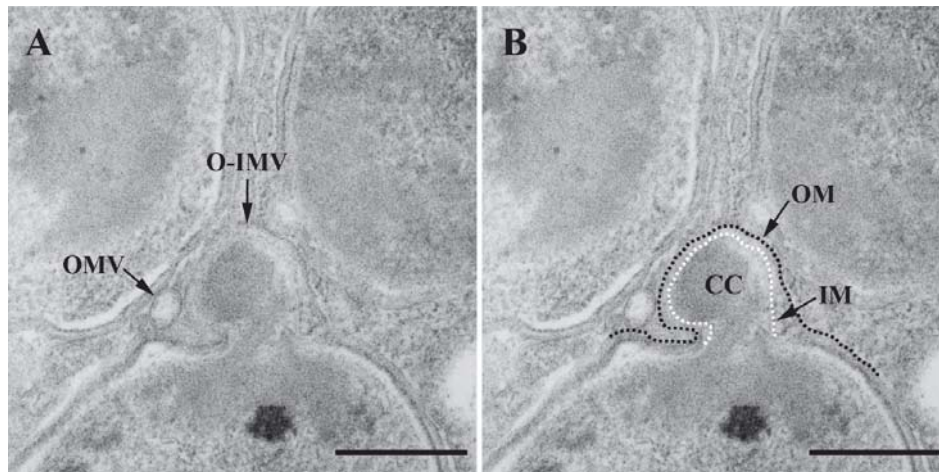




**Figura 4.7. TEM de cortes ultrafinos *A. baumannii* AB41 después de HPF-FS.** La cepa se cultivó en TSA 24 horas a 37°C. Las O-IMVs están señaladas con flecha negra y claramente contienen en su interior un material con el mismo perfil de tinción del citoplasma, con la presencia de un fino granulado que se asemeja mucho a los ribosomas bacterianos. Contenido de citoplasma, CC. Barras de 200 nm.



Por otra parte, en *N. gonorrhoeae* se pudo capturar el momento en el que una O-IMV se estaba formando, confirmando una vez más que la doble bicapa se origina a través de la protuberancia conjunta de la membrana interna y externa (Fig. 4.8). Es importante destacar que las O-IMVs secretadas se observaron en situaciones en que la bacteria no estaba sometida a ninguna situación de estrés, como podría ser la presencia de antibióticos, sustancias quelantes, anticuerpos, etc. Por lo tanto, los resultados indican que las O-IMVs son secretadas en condiciones “naturales” y aparentemente se desprenden de células que no presentaban daños y cuyas envolturas celulares están intactas.



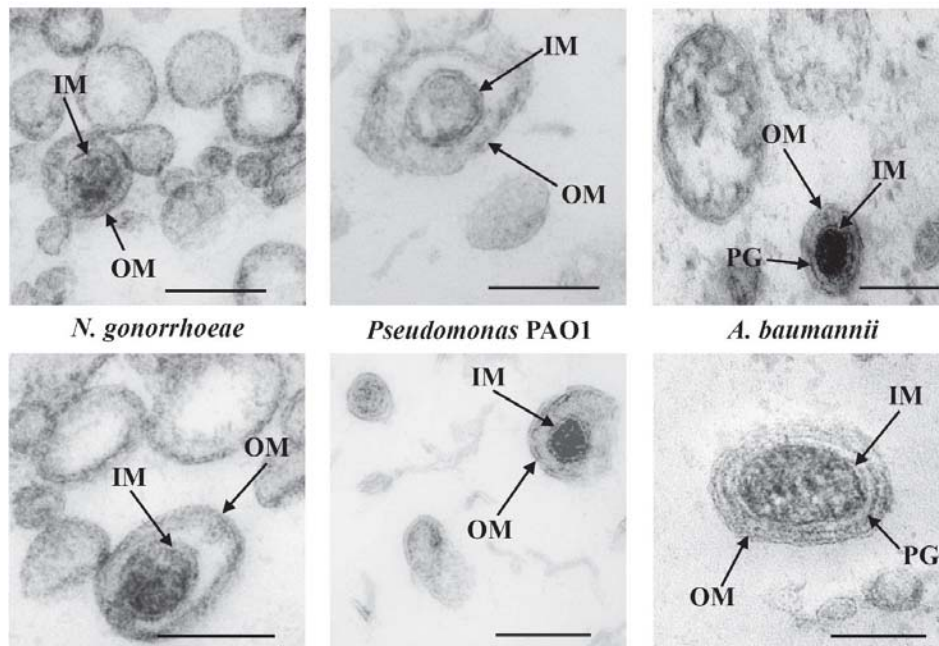
**Figura 4.8.** Imágenes de TEM donde se ilustra la formación de una O-IMVs en *N. gonorrhoeae*. (A) Muestra la protuberancia de la OM y de la IM, incorporando material procedente del citoplasma. (B) La misma imagen que A con las membranas perfiladas para resaltar la formación de la O-IMVs. Barras de 200 nm.

## 2.2 ESTUDIO ESTRUCTURAL DE MVs AISLADAS DE TRES CEPAS PATÓGENAS MEDIANTE TEM DESPUÉS DE HPF-FS.

Se analizaron las vesículas aisladas de las tres cepas incluidas en el estudio, mediante TEM después de HPF-FS. Para *A. baumannii* y *Pseudomonas* PAO1 se obtuvieron las vesículas a partir de cultivos líquidos crecidos hasta el final de la exponencial, mientras que para *N. gonorrhoeae* se aislaron de cultivos confluentes crecidos en agar CHOC durante 48 horas y resuspendidas las células en solución de PBS. Las vesículas se aislaron

por centrifugación a alta velocidad y los pellets iniciales de vesículas se lavaron con PBS y se centrifugaron de nuevo y fueron finalmente sometidos a HPF-FS.

En todos los campos analizados se pudo apreciar una mayor cantidad de OMVs, aunque también se observaron O-IMVs. Éstas, presentaban la misma estructura de doble bicapa lipídica y en la mayoría de casos, contenían un material de alta densidad electrónica en su interior (Fig. 4.9).



**Figura 4.9. TEM de MVs aisladas de tres cepas patógenas.** Las O-IMVs fueron observadas en todas las cepas, presentando la estructura de doble bicapa: OM e IM. Además, en vesículas de *A. baumannii* se pudo observar una capa entre ambas membranas que podría corresponder al peptidoglicano, PG. Barra de 100 nm.

### 2.3 ANÁLISIS MEDIANTE CRYO-EM DE SUSPENSIONES BACTERIANAS DE TRES CEPAS PATÓGENAS.

Para confirmar la existencia de las nuevas O-IMVs en las tres cepas patógenas analizadas, se decidió visualizar directamente las suspensiones bacterianas mediante Cryo-EM con el fin de obtener detalles de la estructura de las bacterias y sus MVs asociadas, en un estado lo más cercano al natural posible. Las suspensiones de células bacterianas se obtuvieron a partir de cultivos de *Pseudomonas* PAO1 y *A. baumannii* en la fase de

crecimiento exponencial, y de cultivos sólidos confluentes de *N. gonorrhoeae*. Las suspensiones se sometieron a una centrifugación suave para eliminar la mayoría de las células y los sobrenadantes clarificados se centrifugaron luego a alta velocidad para sedimentar las células restantes y sus MVs. El sedimento se resuspendió y las suspensiones fueron crioinmovilizadas por “*Plunge-freezing*” (PF) para ser observadas directamente por Cryo-EM.

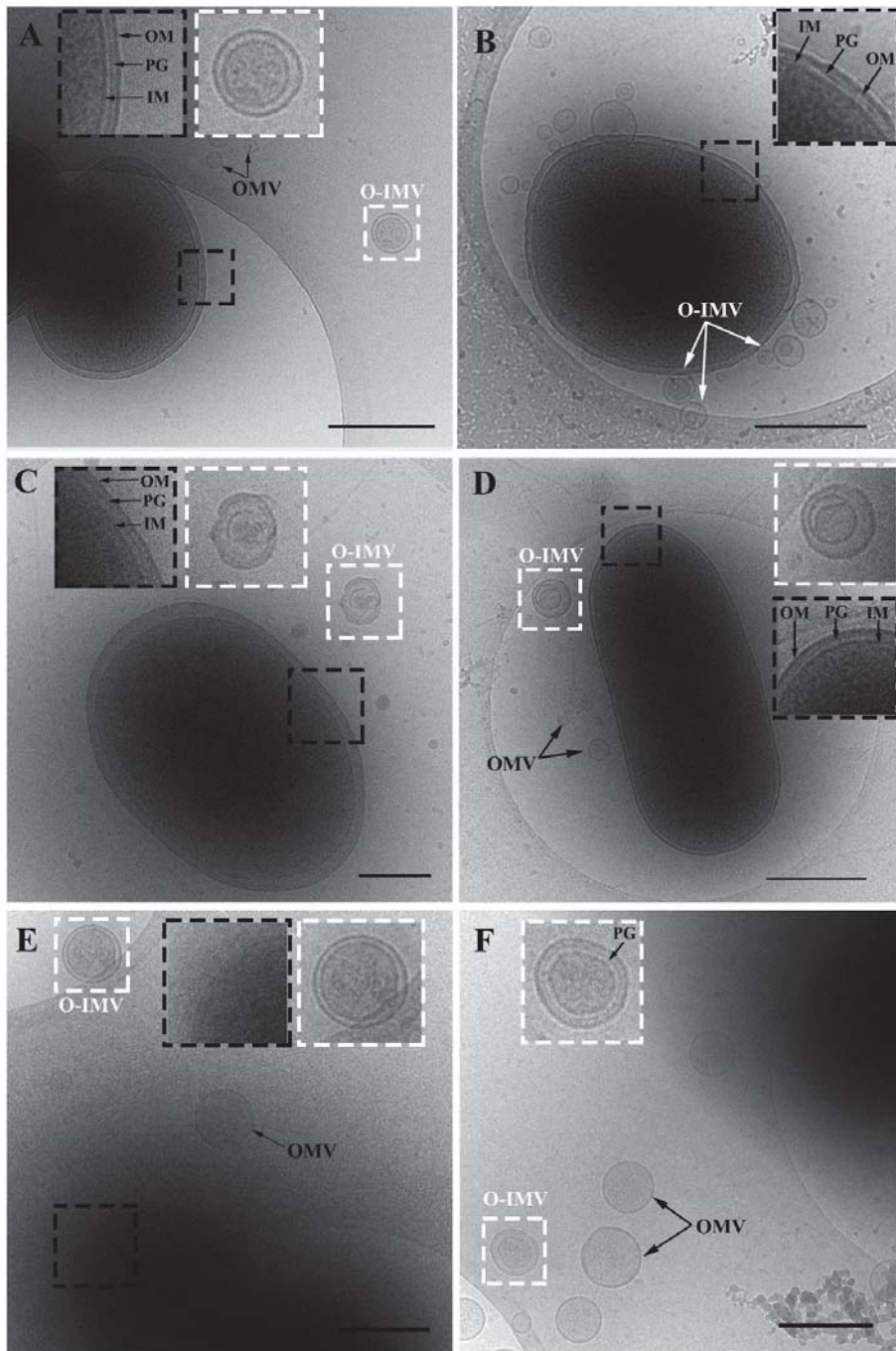
La visualización directa mediante Cryo-EM nos permitió apreciar las principales características de las envueltas de las bacterias gramnegativas (Fig. 4.10), visualizando tanto la membrana externa como la interna y el espacio periplásmico (Fig. 4.10, cuadrados negros). Incluso, en algunas capturas se pudo identificar la capa de peptidoglicano. Es importante tener en cuenta que en Cryo-EM no se emplean agentes potenciadores de contraste ni fijadores químicos lo que, permite una visualización de los especímenes lo más próxima a su estado natural. Por otra parte, se debe tener en cuenta que debido a que las células son visualizadas “enteras”, su grosor aproximado de 500 nm, sólo permite una buena resolución de la parte más periférica de las células y no de su interior. Al mismo tiempo, el grosor intrínseco de las células no permite visualizar ciertos aspectos conocidos como la estructura de bicapa de las membranas bacterianas.

Las observaciones de Cryo-EM confirmaron que las tres cepas patógenas secretaban los dos tipos de MVs (Fig. 4.10). En el caso de las OMVs mostraron la estructura típica de una sola capa externa con un material de baja densidad a los electrones en su interior. Por el contrario, las nuevas O-IMVs mostraron dos capas con el mismo perfil de contraste que la envuelta bacteriana y encapsulando un material altamente denso a los electrones similar al contenido citoplasmático de la célula (Fig. 4.10, cuadrados blancos). Cabe destacar que el grosor de las células (más de 500 nm) dificultó el enfoque simultáneo de las células junto a las vesículas más pequeñas, como es el caso de aquellas vesículas con un tamaño aproximado de 20 nm, las cuales apenas fueron observadas a pesar de su abundancia. Además, las membranas celulares de las tres cepas tenían una apariencia lisa, sin protuberancias que pudieran sugerir que se estaban formando vesículas. Por último, en todas las muestras criofijadas las células presentaban una estructura bien conservada y no se observaron restos celulares, signos de estrés o desintegración celular, descartando el origen de las O-IMVs como desechos celulares.

Otra ventaja de criofijar bacterias mediante PF y posteriormente visualizarlas por Cryo-EM, es que se puede observar la célula entera sin la necesidad de efectuar cortes

---

ultrafinos, descartando que la presencia de las O-IMVs en los cortes ultrafinos sea debido a un artefacto generado por la propia técnica. Por lo tanto, se puede confirmar que las bacterias patógenas estudiadas secretan O-IMVs sin la presencia de ningún agente que altere la estabilidad de las membranas.



**Figura 4.10.** Imágenes de Cryo-EM de suspensiones bacterianas fijadas por “*Plunge-freezing*” y sus MVs. (A,B) *N. gonorrhoeae*, (C,D) *Pseudomonas* PAO1, and (E,F) *A. baumannii*. En las imágenes (A,B,C,D) se puede observar la estructura típica de las envueltas bacterianas de bacterias gramnegativas (los recuadros negros muestran una ampliación). En todas las imágenes se pueden observar las nuevas O-IMVs, junto con OMVs (flecha negra). Las O-IMVs están

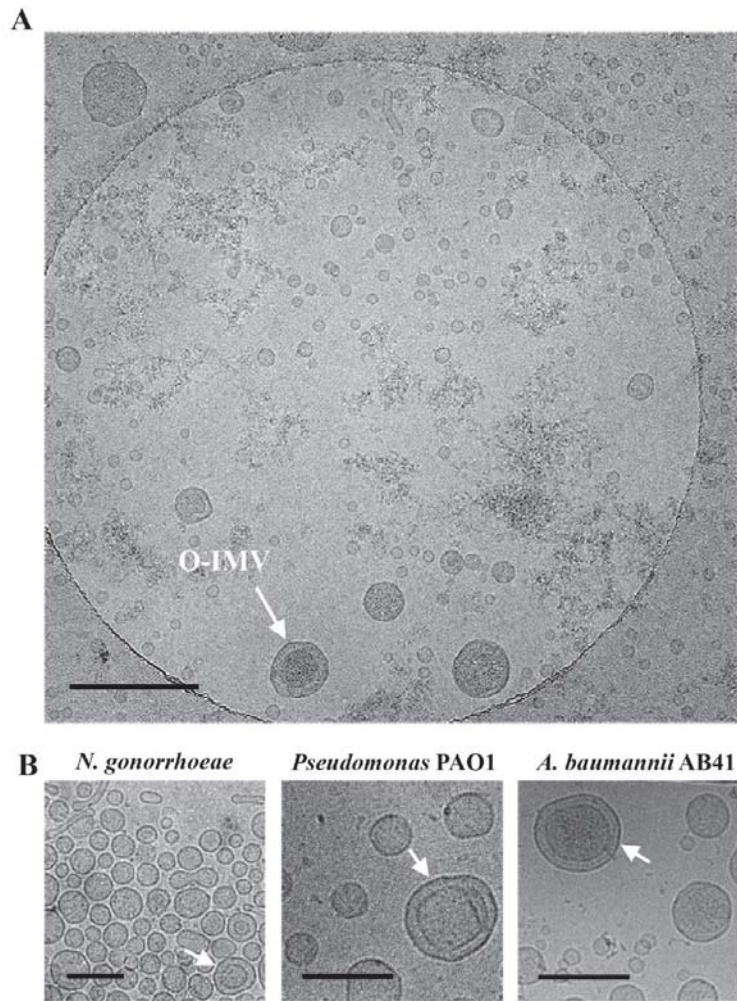
resaltadas por un recuadro blanco en las que se ofrece una ampliación. (B) O-IMVs señaladas con una flecha blanca. Membrana externa, OM; membrana interna, IM; peptidoglicano, PG. Barras de 500 nm (A,B,D,E,F) y (C) 250 nm.

#### **2.4 ESTUDIO ESTRUCTURAL DE MVs AISLADAS MEDIANTE CRYO-EM Y DETERMINACIÓN DE LA PROPORCIÓN DE O-IMVs**

Con el fin de determinar la proporción en que las O-IMVs son secretadas en cada cepa estudiada, y al mismo tiempo obtener unas medidas precisas sobre los diámetros de cada tipo de vesícula, se analizaron mediante Cryo-EM muestras de suspensiones de MVs preparadas por PF. Se emplearon para cada bacteria aquellas condiciones óptimas de crecimiento con el fin de evitar la presencia de fragmentos recircularizados procedentes de la lisis celular. Concretamente, para *N. gonorrhoeae* se obtuvieron de cultivos sólidos, mientras que en *Pseudomonas* PAO1 y *A. baumannii* AB41 se aislaron a partir de cultivos líquidos en fase exponencial de crecimiento, tal y como se ha indicado anteriormente.

Las O-IMVs también fueron visualizadas por Cryo-EM en los concentrados de vesículas de las tres cepas, aunque su presencia era muy escasa en comparación con las OMVs, que eran mucho más abundantes en todos los campos analizados. Para cada bacteria, se contaron manualmente cerca de 7000 vesículas presentes en 100 campos visualizados en dos muestras independientes, y se determinó el porcentaje de O-IMVs respecto al total de MVs. Los resultados fueron que para *Pseudomonas* PAO1 el porcentaje de O-IMVs era del  $0,54\% \pm 0,058$ , para *A. baumannii* AB41 era del  $0,23\% \pm 0,056$  y en *N. gonorrhoeae* era  $1,2\% \pm 0,07$ . Es necesario indicar que a pesar de que la proporción de O-IMVs fue mucho mayor en *N. gonorrhoeae* respecto a las otras dos cepas, no se puede concluir que ésta cepa produzca más O-IMVs, debido a que se aislaron a partir de cultivos sólidos y por lo tanto, no es posible su comparación.





**Figura 4.11. Cuantificación de la proporción O-IMVs en suspensiones de MVs vitrificadas y visualizadas mediante Cryo-EM.** (A) Vista general de uno de los campos analizados de *A. baumannii* en los que se puede observar la presencia mayoritaria de OMVs de tamaños muy distintos, siendo más abundantes las vesículas de menor tamaño. Además, se observa una O-IMVs, con una doble membrana (flecha blanca). (B) Imágenes de Cryo-EM de las suspensiones de vesículas para cada bacteria, donde se observan tanto OMVs como O-IMVs (flecha blanca). En *A. baumannii* se puede observar la presencia del peptidoglicano. En todas las bacterias las OMVs eran mucho más abundantes que las O-IMVs. Barra de 500 nm (A) y 200 nm (B).

**Tabla 4.2. Medias y rango de los diámetros de OMVs y O-IMVs para cada cepa analizada.** Expresado en nm.

Cepa	OMV		O-IMV	
	media $\pm$ SD	Rango	Media $\pm$ SD	Rango
<i>N. gonorrhoeae</i>	57 $\pm$ 19	25 –140	85 $\pm$ 26	40 –170
<i>Pseudomonas PAO1</i>	85 $\pm$ 28	30 –165	135 $\pm$ 34	55 –145
<i>A. baumannii AB41</i>	44 $\pm$ 32	15 –320	109 $\pm$ 52	65 –260

También calculamos los diámetros de ambos tipos de vesículas (Tabla 4.2). El rango de tamaño más frecuentemente observado en las OMVs fue de 40–60 nm para *N. gonorrhoeae*, 20–40 nm para *A. baumannii* y 50–100 nm para *Pseudomonas PAO1*, mientras que el rango de tamaño medio de las O-IMVs estaba comprendido entre 60–100 nm para *N. gonorrhoeae*, 100–140 nm para *Pseudomonas PAO1* y 125–160 nm para *A. baumannii*. En los campos analizados no se apreciaron fragmentos de membrana recircularizados en las muestras.

## 2.5 CONTENIDO DE DNA ASOCIADO A LAS MVs DE TRES CEPAS BACTERIANAS PATÓGENAS

El DNA fue cuantificado a partir de tres muestras independientes de MVs mediante el kit comercial “*Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit*”. Antes de la cuantificación de DNA, las muestras de vesículas fueron separadas en dos alícuotas. Una de ellas recibió un tratamiento externo con DNAsa y posteriormente ambas fueron lisadas con Triton X-100 al 0,125%, de la misma manera a lo previamente descrito para *S. vesiculosa M7<sup>T</sup>*. El contenido de DNA incluido en las MVs de las tres cepas se muestra en la Tabla 4.3. Como cabía esperar la mayor parte del DNA se encontraba en el interior de las MVs.



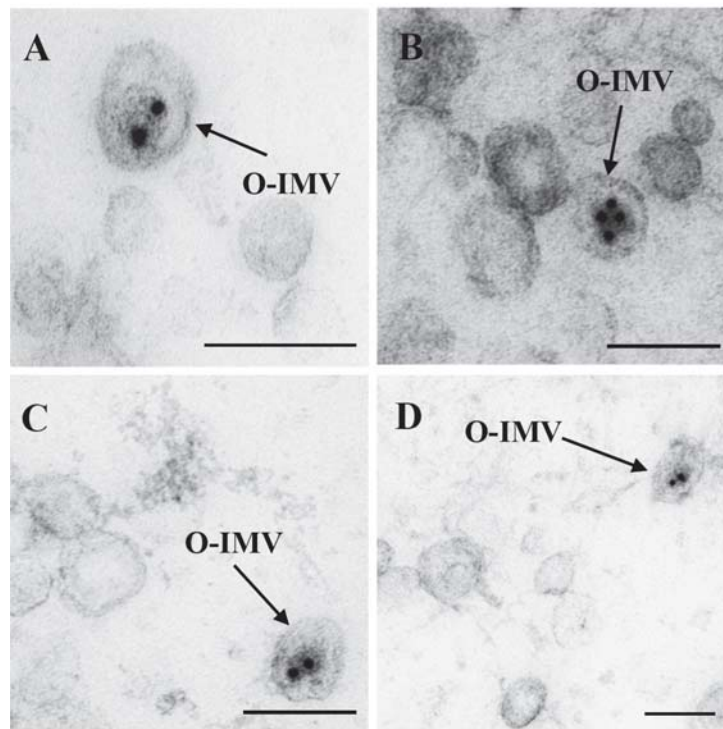
**Tabla 4.3. Cuantificación de DNA y ATP en las MVs de las tres cepas patógenas estudias.** (a) Los resultados de DNA se expresan en ng DNA /  $\mu\text{g}$  proteína (n=3,2) .(b) Para el ATP los resultados se expresan como nmol/g proteína (n=2).

Cepa	DNA <sup>a</sup>			ATP <sup>b</sup>
	+ DNAsa	- DNAsa	% DNA internalizado	
<i>N. gonorrhoeae</i>	1.11 $\pm$ 0.26	1.87 $\pm$ 0.42	<b>59</b>	0.57 $\pm$ 0.27
<i>Pseudomonas</i> PAO1	0.13 $\pm$ 0.04	0.20 $\pm$ 0.06	<b>65</b>	0.09 $\pm$ 0.01
<i>A. baumannii</i> AB41	1.54 $\pm$ 0.30	2.64 $\pm$ 1.23	<b>62</b>	2.61 $\pm$ 1.07

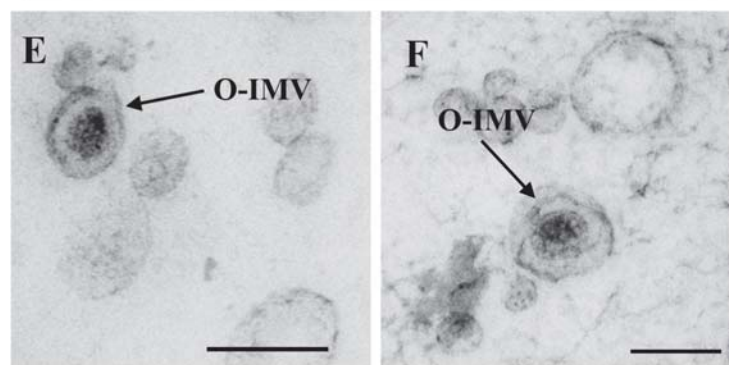
A continuación, para confirmar que el DNA detectado en las vesículas se encontraba en el interior de las O-IMVs se realizó un inmunomarcaje sobre cortes ultrafinos de MVs. Decidimos emplear para dicho estudio las MVs procedentes de *N. gonorrhoeae* debido a que esta cepa presenta una mayor proporción de O-IMVs en las condiciones ensayadas. Para ello, se aislaron vesículas a partir de cultivos confluentes en agar chocolate incubados durante 48 horas. Las vesículas fueron tratadas externamente con DNAsa y posteriormente criofijadas, criosustituidas e incluidas en la resina Lowicryl HM20. Los cortes ultrafinos fueron depositados en una rejilla de cobre y tratados con 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteinasa K durante 15 minutos a 37°C para exponer el DNA. Para el inmunomarcaje sobre cortes ultrafinos se utilizó un anticuerpo monoclonal específico para DNA de doble cadena y un anticuerpo secundario conjugado con oro (12 nm), tal como se utilizó para *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> (Fig. 4.12, A-B-C-D).

En los cortes visualizados mediante TEM se pudieron observar ambos tipos de vesículas, aunque la marca de oro mayormente fue localizada en el interior de las O-IMVs, confirmando que éstas contienen material procedente del citoplasma. Para confirmar que el marcate era específico se añadieron dos controles, en el primero se omitió el anticuerpo primario para garantizar que no hubiera marca inespecífica producida por el anticuerpo secundario contra componentes de las vesículas de *N. gonorrhoeae* (Fig. 4.12, F). En el segundo control, se realizó un tratamiento de los cortes con DNAsa durante toda la noche con el fin de degradar el DNA presente en las muestras (Fig. 4.12, G).

### *Inmunomarcaje de DNA*



### *Controles*



**Figura 4.12. Inmunomarcaje de MVs de *N. gonorrhoeae*.** (A, B,C,D) Imágenes de TEM que muestran O-IMVs con marca de oro localizado en la zona con elevada densidad electrónica delimitada por una bicapa lipídica, confirmando que las O-IMVs empaquetan DNA. Se utilizó como Ac. Primario un anticuerpo monoclonal específico para ds-DNA y un anticuerpo secundario conjugado con oro (12 nm), Controles: (F) Imagen de TEM en la que se ha omitido el anticuerpo primario. (G) Imagen de TEM donde la rejilla ha recibido previamente un tratamiento con DNAsa

antes de realizar el inmunomarcaje. En ambos controles no se vislumbró marcaje con oro, confirmando la especificidad del marcaje de DNA. Barras de 100 nm.

## 2.5 ESTUDIO PROTEÓMICO DE MVs PURIFICADAS DE *N. gonorrhoeae*

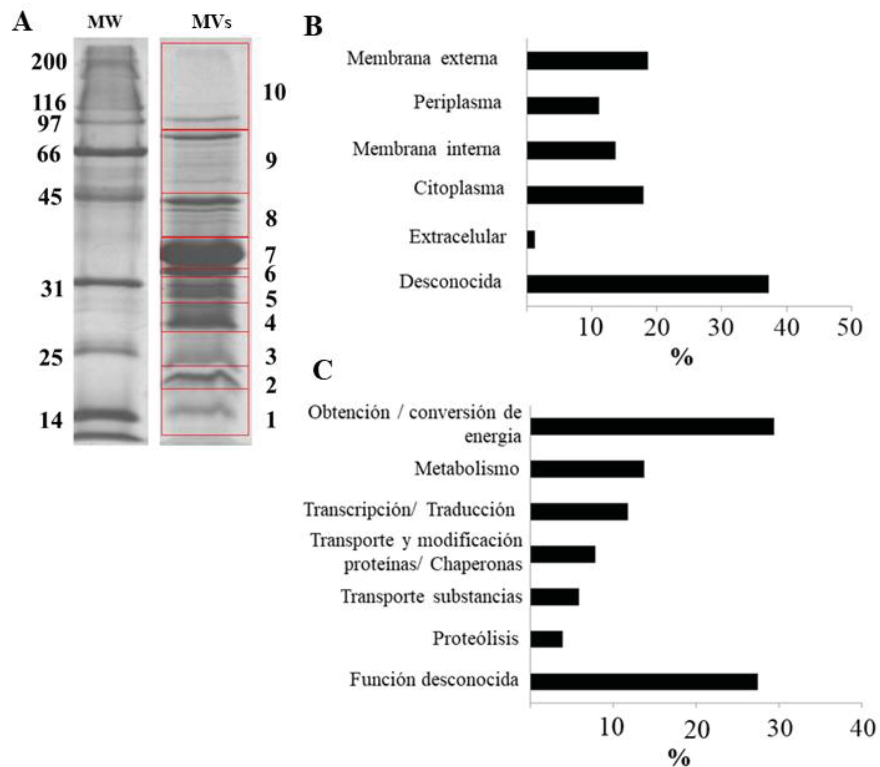
Los análisis proteómicos de vesículas purificadas de *Pseudomonas* PAO1 y *A. baumannii* han sido publicados por otros grupos (Choi et al., 2011; Kwon et al., 2009), describiendo la presencia de numerosas proteínas procedentes del citoplasma y membrana interna asociadas a vesículas.

Para identificar las proteínas presentes en las MVs de *N. gonorrhoeae* y determinar su localización, se llevó a cabo un estudio proteómico. Con este objetivo, muestras de MVs fueron purificadas mediante gradientes de Optiprep® para eliminar posibles contaminantes producidos durante la lisis celular, siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos apartado 2.2. A continuación, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida 1D-SDS y se procesó todo el perfil de bandas de la muestra para así describir el mayor número posible de proteínas (Fig. 4.13, A).

Se identificaron un total de 161 proteínas asociadas a MVs y fueron clasificadas por su localización subcelular con el programa PSORTb v3.0.2 (Fig. 4.13, B). El 18,6% del total de proteínas detectadas procedían de la OM, y estaban involucradas en la biogénesis de la pared celular y en el transporte de sustancias. Es importante destacar, que algunas de las proteínas identificadas en la proteómica de vesículas de *N. gonorrhoeae* intervienen en la virulencia de la cepa, como es el caso de las proteínas relacionadas con el Pilus, las proteínas de membrana externa denominadas “*opacity-associated proteins*” (Opa proteins) o la proteína de superficie reguladora del complemento, NspA. También se detectaron proteínas procedentes del periplasma (11,2%).

Al igual que en la mayoría de estudios proteómicos, en las MVs de *N. gonorrhoeae* también se detectaron proteínas de la membrana interna (13,7%) y del citoplasma (18%), cuyas funciones se encuentran recogidas en la Figura 4.13-C. De las proteínas más abundantes de la IM y con función conocida destacaron la proteasa encargada del procesamiento del grupo carboxilo terminal (*carboxy-terminal processing protease*) y la proteína DsbD implicada en ensamblaje del complejo del citocromo. Las proteínas más abundantes del citoplasma fueron la piruvato deshidrogenasa, la chaperonina de 60 kDa y el factor de elongación Tu, EF-Tu. De forma similar a otras proteómicas, se detectaron varias proteínas del ribosoma, tanto de la fracción 50S como de la 30S. Además, se identificaron varias proteínas de localización extracelular (1,2%). Curiosamente, para un

alto porcentaje de las proteínas identificadas (37,5 %) su localización subcelular era completamente desconocía o por lo contrario, presentaban más de una localización. En este último grupo se encuentran varios factores de virulencia como la endopeptidasa IgA y las proteínas del “*PilS cassette*”. La localización subcelular y función biológica de cada una de las proteínas identificadas en las MVs de *N. gonorrhoeae* se encuentra en la Tabla A1 (Anexos).



**Figura 4.13. Contenido de proteínas asociado a MVs de *N. gonorrhoeae*.** (A) Perfil de proteínas de geles 1D-SDS-PAGE de MVs purificadas en las que se detallan los 10 fragmentos cortados para su posterior digestión y análisis proteómico. (B) Localización subcelular de las proteínas identificadas. (C) Clasificación funcional de las proteínas procedentes del citoplasma y IM caracterizadas en las MVs de *N. gonorrhoeae*.

## 2.6 DETECCIÓN DE ATP EN MUESTRAS DE MVs DE CEPAS PATÓGENAS.

El ATP es un componente del citoplasma y es la moneda de intercambio energético universal utilizada en muchos procesos biológicos. En los últimos años, varios informes han detectado la presencia de ATP extracelular en los sobrenadantes del cultivo de una

amplia variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas. Sin embargo, el mecanismo por el cual se secreta al medio continua siendo desconocido (Mempin et al., 2013). Se realizó una cuantificación de ATP en MVs aisladas de las tres cepas patógenas usando el ensayo de viabilidad celular *BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay*®. Este ensayo permite la cuantificación de ATP mediante la producción de bioluminiscencia gracias a la presencia del enzima luciferasa y la luz emitida se correlaciona con una curva estándar de ATP. Se detectó ATP asociado a las MVs en las tres cepas patógenas, y la señal luminiscente obtenida para todas las muestras fue de aproximadamente  $10^5$  unidades de luz relativa (RLU). La concentración de ATP referida a proteína se detalla en la Tabla 4.3.

## 2.8 SEPARACIÓN DE LAS O-IMVs DE LAS OMVs

De acuerdo a los resultados obtenidos, las nuevas O-IMVs son secretadas por diversas bacterias gramnegativas, en condiciones de crecimiento óptimas y sin la presencia de ningún agente estresante. Además, todo parece indicar que se liberan en una proporción determinada. Por lo tanto, el siguiente paso para continuar su caracterización como nuevo tipo de MVs en bacterias gramnegativas fue el de proceder a la separación de las O-IMVs de las OMVs convencionales.

Para ello, se decidió emplear la ultracentrifugación mediante gradiente de Optiprep® descrito por Zhang y colaboradores (2010), en el que emplea un gradiente del 5%, 10%, 20%, 40% y que corresponden a unas densidades de 0,98 - 1,058 - 1,11 - 1,215 g/mL respectivamente. Para poder monitorizar la separación de ambos tipos de vesículas utilizamos un marcador de contenido citoplasmático extremadamente sensible, debido a que las O-IMVs se encuentran en mucha menor proporción que las OMVs. Por lo tanto, decidimos emplear la técnica de PCR para detectar la presencia de DNA en vesículas introduciendo el plásmido PBBr\_MCS1 en la cepa *Pseudomonas* PAO1 (Kovach et al., 1995).

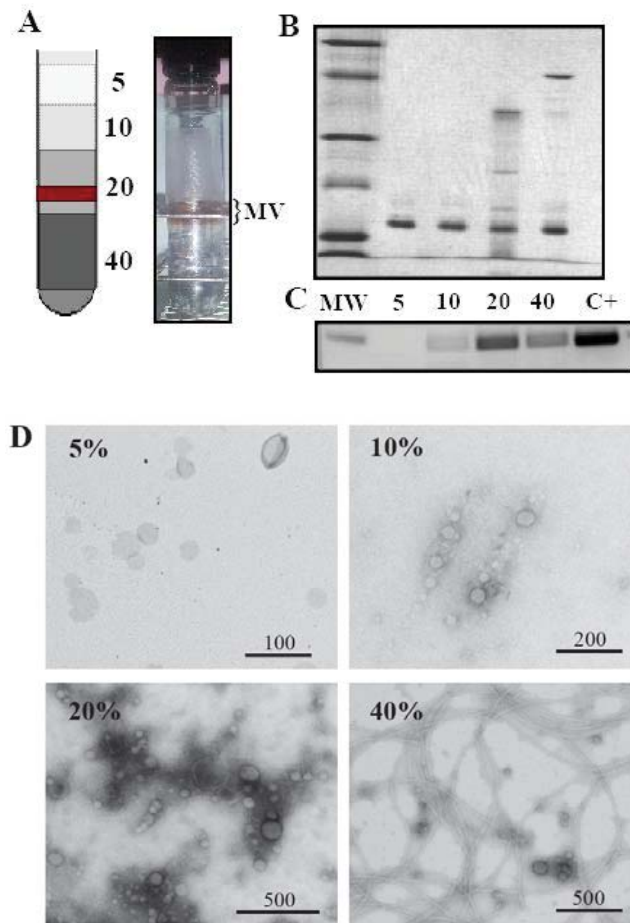
En primer lugar, se introdujo el plásmido PBBr\_MCS1 en la cepa *Pseudomonas* PAO1 mediante electroporación y los transformantes fueron seleccionados por su resistencia al cloranfenicol (0,4 mg/mL). La cepa transformante fue cultivada en LB a 37°C durante 12 horas y agitada a 115 rpm. Las vesículas se aislaron a partir de un volumen de 2L de sobrenadante y se resuspendieron en 10 mM HEPES/0,85% NaCl a un pH de 7,4. Seguidamente, se descartó la presencia de bacterias en las muestras aisladas de vesículas

mediante una prueba de esterilidad y también se sometieron a un tratamiento externo con DNAsa. A continuación, se separó una alícuota de vesículas y se extrajo el DNA plasmídico con un kit comercial para confirmar su presencia en el interior de las vesículas mediante amplificación por PCR. Una vez detectado el plásmido en vesículas se procedió a realizar la separación de las vesículas mediante gradientes de Optiprep®.

Para la preparación del gradiente se partió de una solución de trabajo del 40% de Optiprep®. Las diferentes concentraciones de Optiprep® se añadieron a la suspensión de MVs aisladas en el siguiente orden: 4 mL de la solución del 40% de Optiprep®, 3 mL de la 20%, 1 mL de 10% y 1 mL del 5% (Fig. 4.14, A). Los gradientes se centrifugaron a 100.000 g (36.000 rpm) en el rotor Ti70.1 a 4°C durante 18.00 h en una ultracentrífuga OPTIMA™ L-90K (Beckman Coulter). Los gradientes fueron separados en fracciones, i cada fracción fue dializada y concentrada a través de filtros de Amicon® Ultra 10 KDa. Los concentrados de vesículas obtenidos fueron empleados para realizar una tinción negativa, gel de proteínas y extracción del DNA plasmídico.

De las diferentes fracciones analizadas la mayor parte de las vesículas se encontraban en la fracción de densidad 1,11 g/mL, es decir del 20% de Optiprep® y en la que se pudo visualizar a simple vista una franja de color rosado intenso (Fig. 4.14, A- fotografía tubo). También se confirmó que la mayor parte de las vesículas se encontraba en la fracción de 20%, mediante geles de proteínas 1D-SDS (Fig. 4.14, B). El plásmido se extrajo de las 4 fracciones y se amplificó mediante PCR para determinar si se encontraba en todas las fracciones, detectando su presencia en las fracciones del 10, 20 y 40%, mientras que la fracción del 5% no se observó señal de amplificación (Fig. 4.14, C).

Para confirmar la presencia de vesículas se realizaron tinciones negativas de las distintas fracciones, detectando MVs en todas las fracciones. No obstante, en la fracción del 5% se detectó la presencia de unas estructuras esféricas que se asemejaban a vesículas, aunque tenían un aspecto poco usual y parecían más bien estructuras vacías o “esqueletos” de vesículas. Las tinciones correspondientes a la fracción del 20% confirmaron que ésta contenía la mayor cantidad de MVs sin la presencia de otros elementos, mientras que en la fracción del 40% se detectó la presencia de unos filamentos que correspondían al flagelo bacteriano (Fig. 4.14, D).



**Figura 4.14. Análisis de las diferentes fracciones de gradientes de Optiprep realizados en MVs de *Pseudomonas* PAO1.** (A) Esquema representando los diferentes gradientes de Optiprep® empleados (5, 10, 20 y 40%) y la localización de las MVs después de la ultracentrifugación. Además, se adjunta una fotografía del tubo donde se observa una franja rosácea que se correspondió con la mayor cantidad de MVs. (B) Perfiles de proteínas de cada fracción teñidas con azul de comassie. (C) Gel de agarosa en el que se analizó el amplificado del plásmido de cada fracción del gradiente. Todas las fracciones presentaron marcaje positivo con excepción de la fracción del 5%. (D) Imágenes de TEM de tinciones negativas del concentrado de cada fracción. En la fracción 5% se puede observar la presencia de estructuras que se asemejan a vesículas lisadas. Además, confirmamos que la fracción del 20% es la que presenta una mayor cantidad de vesículas. En la fracción del 40%, aunque se observan vesículas, se visualiza mayoritariamente flagelo bacteriano.

Este experimento consistía en separar ambos tipos de vesícula por su densidad, es decir, por su tamaño. Es importante tener en cuenta que a pesar de que las O-IMVs presentan un diámetro ligeramente mayor que las OMVs, los rangos de tamaño de ambos tipos suelen encontrarse solapados. Sin embargo, las OMVs si suelen ser más pequeñas (~20

nm) respecto las O-IMVs (~50 nm). Por lo tanto, nuestro objetivo era encontrar una fracción en que no hubiera DNA, indicando que disponíamos de una fracción libre de las O-IMVs. Pero se detectó DNA en todas las fracciones de vesículas menos en la fracción del 5% en la que se observaron unas estructuras vesiculares atípicas. Por lo tanto, la estrategia de separar ambos tipos de vesículas mediante gradientes de densidad de Optiprep® y ultracentrifugación resultó fallida.

## 2.9 INDUCCIÓN DE LA FORMACIÓN DE O-IMVs CON ANTIBIÓTICOS

Kadurugamuwa y Beveridge (1995) describieron para *Pseudomonas aeruginosa* la formación de un tipo más “complejo” de vesícula de membrana que tenía lugar al exponer un cultivo bacteriano al antibiótico gentamicina. Este tipo más complejo de vesículas podría asemejarse a las O-IMVs, aunque la calidad de las imágenes aportadas por los autores y la escasa caracterización no permite confirmarlo. Además, un estudio realizado en *A. baumannii* también muestra que tras el cultivo de la cepa con ceftazidima se observaron unas vesículas semejantes a las O-IMVs (Koning et al., 2013).

Con el fin de detectar un incremento en la producción de O-IMVs, se procedió a realizar un estudio en el que se obtuvieron MVs de *P. aeruginosa* PAO1 después de ser expuesta a la presencia de dos antibióticos diferentes con distintos mecanismos de acción a nivel de envuelta bacteriana. En primer lugar, se trabajó con el antibiótico tipo lipopéptido cíclico denominado colestina o Polimixina E, que afecta la estabilidad de toda la envuelta bacteriana, intercalándose en la OM bacteriana y produciendo un efecto detergente que ocasiona un incremento de la permeabilidad de la envuelta bacteriana conduciendo a la muerte celular. El otro antibiótico incluido en el estudio fue la ceftazidima, una cefalosporina de tercera generación que actúa inhibiendo la síntesis del peptidoglicano y por lo tanto, alterando la integridad de la envuelta bacteriana y provocando la lisis celular.

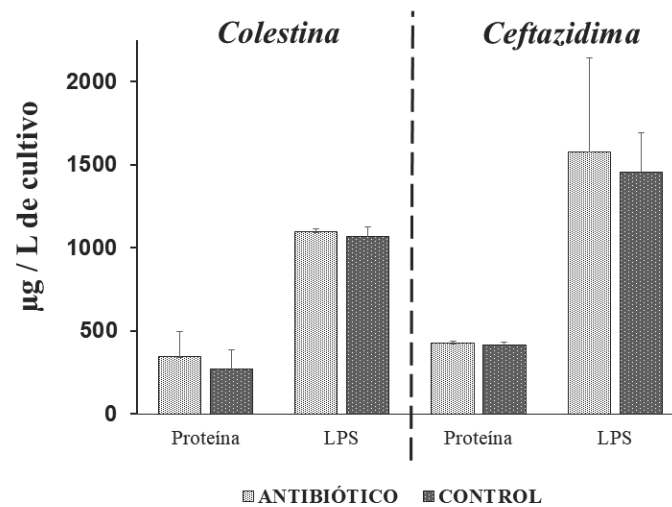
Para empezar, se ajustaron las concentraciones de antibiótico a emplear durante la inducción. Kadurugamuwa y Beveridge (1995) para inducir la formación de MVs utilizaron una concentración de antibiótico 4 veces superior a la concentración mínima inhibitoria (MIC). Sin embargo, las imágenes mostradas de la bacteria presentaban una estructura celular muy alterada. En cambio, en el estudio realizado en *A. baumannii* se emplearon unas concentraciones de antibiótico subóptimas, es decir inferiores a la MIC. En nuestro caso, decimos emplear la MIC que para nuestra cepa de *P. aeruginosa* era de 4 mg/L para la colestina y 32 mg/L para ceftazidima.



Para empezar, se procedió a analizar el efecto bactericida de las concentraciones de antibiótico en cultivos bacterianos con una elevada densidad celular, con el fin de descartar que las concentraciones de antibiótico utilizadas pudieran inducir una lisis masiva, produciendo abundantes restos celulares de tipo membranoso. Para ello, se realizaron tres cultivos bacterianos y se dejaron crecer hasta una DO de 1 y se añadieron los antibióticos a una concentración final equivalente a la MIC. Seguidamente, se monitorizó el crecimiento mediante el seguimiento de la DO a 600 nm durante 4 horas, observando que a pesar de añadir antibióticos al medio, los cultivos continuaban creciendo exponencialmente. No obstante, la velocidad de crecimiento se vió reducida desde la primera hora de cultivo de la cepa en presencia de antibióticos.

Por tanto, se decidió estudiar la formación de las O-IMVs tras una incubación con antibióticos de 1 hora. Para el experimento, *P. aeruginosa* PAO1 se cultivó en 2 L de LB utilizando matraces de 4 L hasta una DO<sub>600</sub> de 1. En este punto, en uno de los matraces se añadió el antibiótico mientras que el otro fue empleado como control, y se dejó incubar durante una hora (DO<sub>600</sub> ~ 1,3). Seguidamente las vesículas de ambas condiciones fueron aisladas y se calculó el contenido de DNA, proteína y LPS. Además, se realizó una Cryo-EM de las suspensiones de MVs.

Se calcularon los rendimientos del cultivo mediante el cálculo de la proteína y el LPS (Fig. 4.19). No se observaron grandes diferencias entre los valores de proteína o LPS de los cultivos inducidos con antibióticos respecto al cultivo control. No obstante, se apreció un ligero incremento en los cultivos inducidos, pero mediante el análisis estadístico no se pudieron apreciar diferencias significativas.



**Figura 4.19.** Gráfico que muestra los valores medios de proteína y LPS ( $\mu\text{g}$ ) asociados a MVs obtenido a partir de 1L de cultivo, obtenidos para cada antibiótico con su control. No se observan diferencias entre los cultivos inducidos con antibióticos y el control, aunque se aprecia un ligero incremento en el número de MVs en los cultivos inducidos,  $n=2$ .

Para detectar un incremento en la proporción de contenido del citoplasma en muestras de MVs inducidas con antibióticos, se calculó la cantidad de DNA asociado a cada muestra antes y después del tratamiento con DNAsa. La Tabla 4.4 recoge los valores de DNA normalizados respecto a la cantidad de LPS para ambos antibióticos y sus controles. Se observó un incremento de la proporción DNA/LPS en las MVs inducidas por colestina, tanto con o sin tratamiento de DNAsa, pasando de valores de  $261,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$  a  $426,1 \text{ ng}/\mu\text{L}$  en las muestras tratadas con DNAsa. Asimismo, la proporción de DNA internalizado (%) en la cepa control (59%) fue más alta que con colestina (70%), sugiriendo una mayor proporción de DNA extracelular en las MVs con antibiótico posiblemente producido por la lisis celular.

Por el contrario, las MVs de ceftazidima contenían una menor cantidad de DNA ( $172,2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) que las MVs control ( $206,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) y no se observaron diferencias entre el grado de DNA internalizado entre las MVs de ceftazidima y su control, siendo 57 y 52% respectivamente.

**Tabla 4.4. Valores de DNA normalizados respecto a la cantidad de LPS de MVs control y MVs producidas en presencia de antibióticos (ng DNA/ µg de LPS).**

<b>Colestina</b>						
Réplica	<i>Control</i>			<i>Antibiótico</i>		
	DNAsa +	DNAsa -	%	DNAsa +	DNAsa -	%
<b>I</b>	187.0	338.9	<b>55</b>	271.13	682.78	<b>40</b>
<b>II</b>	336.1	396.4	<b>85</b>	581.06	733.19	<b>79</b>
<b>media</b>	261.5	367.7	<b>70</b>	426.1	708.0	<b>59</b>
<b>SD</b>	105.5	40.7	<b>21</b>	219.1	35.7	<b>27.96</b>

<b>Ceftazidima</b>						
Réplica	<i>Control</i>			<i>Antibiótico</i>		
	DNAsa +	DNAsa -	%	DNAsa +	DNAsa -	%
<b>I</b>	305.7	481.6	<b>63</b>	173.7	313.7	<b>55</b>
<b>II</b>	107.3	261.5	<b>41</b>	170.6	295.7	<b>58</b>
<b>media</b>	206.5	371.5	<b>52</b>	172.2	304.7	<b>57</b>
<b>SD</b>	140.3	155.7	<b>16</b>	2.2	12.7	<b>1.64</b>

Las MVs obtenidas en las distintas condiciones se observaron por Cryo-EM (Fig. 4.20). A nivel estructural se observó que las vesículas obtenidas tras la inducción con colestina tenían las membranas onduladas, indicando que había una alteración de la membrana. Mientras que las MVs obtenidas de cultivos con ceftazidima mostraban la misma apariencia que las vesículas control.

En ninguno de los casos se observó un incremento en la presencia de O-IMVs en las suspensiones de vesículas mediante Cryo-EM. Es más, para las MVs procedentes de cultivos inducidos con colestina no se observaron O-IMVs en ninguno de los 100 campos analizados, a pesar de detectar un incremento del DNA. En cambio, para las MVs de cultivos con ceftazidima si se visualizaron O-IMVs, aunque en la misma proporción que en la muestra control. Este experimento no permitió detectar un incremento significativo de la vesiculación asociado a la presencia de antibióticos

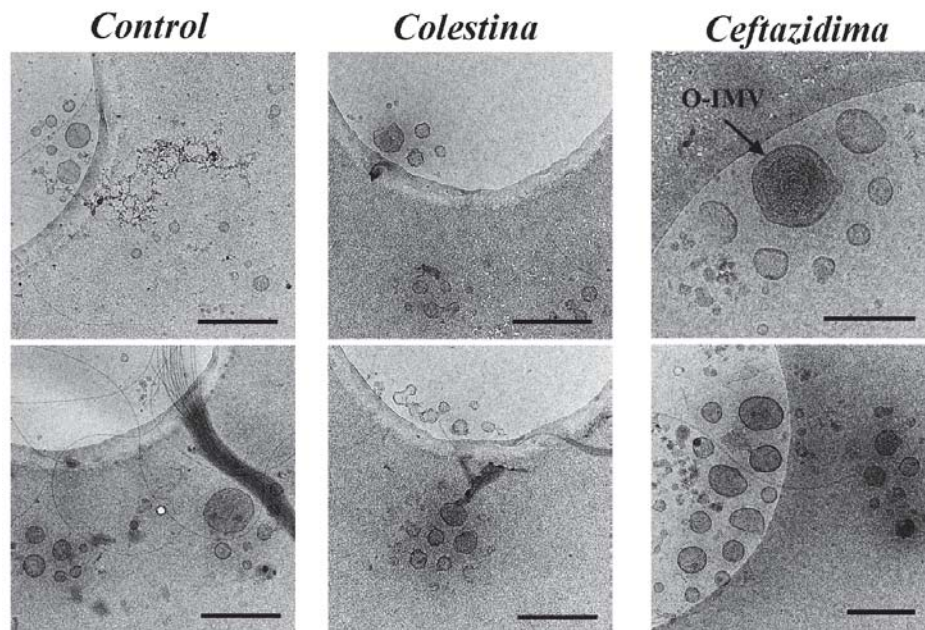


Figura 4.20. Imágenes de Cryo-EM de MVs de *P. aeruginosa* PAO1 obtenidas a partir de cultivos con antibióticos. Barras de 500 nm.

### 3. ESTUDIO MICROSCÓPICO DE LAS MVs OBTENIDAS DEL MUTANTE HIPERVESICULANTE DE *Escherichia coli* Nissle $\Delta tolR$

Se han descrito diversas mutaciones que generan fenotipos hipervesiculantes en bacterias gramnegativas (Bernadac et al., 1998; Elhenawy et al., 2016; A. J. Kulp et al., 2015; Mcbroom & Kuehn, 2007; Roier et al., 2016). Generalmente, estas mutaciones se efectúan en componentes estructurales de la envuelta bacteriana (LPS, proteínas estructurales, lípidos) o bien, en elementos que se encargan de mantener la homeostasis de la envuelta bacteriana. Una de las mutaciones más frecuentemente empleadas para la obtención de fenotipos hipervesiculantes es la delección de la proteína *tolR* de la envuelta bacteriana. Ésta forma parte del sistema *tol-pal*, un complejo proteico de transmembrana formado por un conjunto de lipoproteínas que mantienen el PG asociado a la OM y a la IM mediante uniones no-covalentes e interaccionan con la porina OmpA. (véase introducción, apartado 1.3.1).

Curiosamente, siempre se ha considerado que este incremento en la vesiculación se produce sin alterar la estabilidad de la membrana, ya que la mutación no repercute ni en

el crecimiento bacteriano ni tampoco en la supervivencia de la bacteria frente a la presencia de agentes tóxicos (antibióticos, detergentes, agentes quelantes, etc) o en condiciones de crecimiento hostiles. El fenotipo hipervesiculante, que comporta el incremento de MVs secretadas, normalmente se verifica mediante el cálculo del aumento en el contenido de proteína, LPS o lípidos presentes en el sobrenadante en el que ha crecido la cepa. Sin embargo, ninguno de estos estudios ha realizado una caracterización estructural comparando la cepa mutante y sus MVs, con la cepa salvaje y sus vesículas, para confirmar que realmente no se produce una alteración en las mismas.

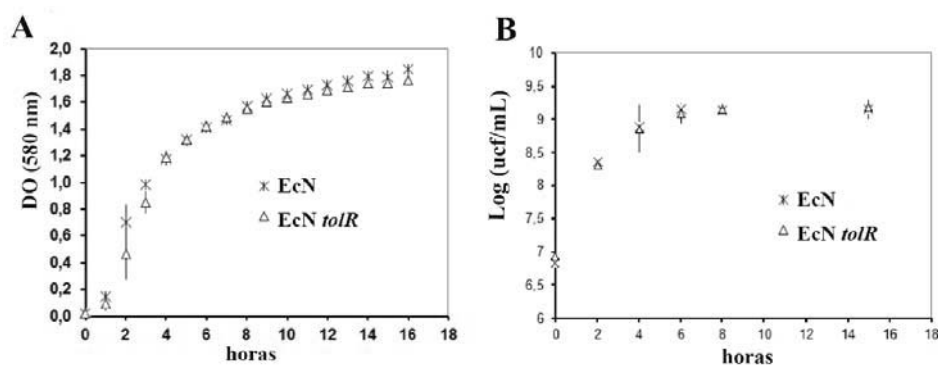
Por esta razón decidimos realizar la caracterización estructural de un mutante  $\Delta tolR$  de *Escherichia coli* Nissle (EcN  $\Delta tolR$ ) y la cepa salvaje (EcN) para caracterizar estructuralmente las vesículas del mutante  $\Delta tolR$  mediante TEM después de HPF-FS y Cryo-EM. Al mismo tiempo, se ha querido determinar si dicha mutación producía un incremento en la secreción de las O-IMVs.

Esta fase del trabajo se realizó en colaboración con el grupo “Interacción microbiota - epitelio intestinal” dirigido por la Dra. Baldomà y la Dra. Badia del Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Farmacia de la UB. El grupo está centrado en el estudio de la interacción de MVs procedentes de cepas de *Escherichia coli* probióticas, como *Escherichia coli* Nissle, con el huésped. Uno de los mayores inconveniente de trabajar con cepas de *E. coli* es que generalmente secretan muy pocas MVs *in vitro*, obteniendo unos rendimientos de recuperación de vesículas muy bajos a partir de los sobrenadantes. Por esta razón, el grupo realizó un mutante EcN  $\Delta tolR$  para incrementar la vesiculación, pero antes se caracterizó estructuralmente la cepa mutante y sus MVs respecto la cepa salvaje.

### 3.1 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE EcN Y LA CEPA MUTANTE $\Delta tolR$ .

Se evaluó el efecto de la mutación  $\Delta tolR$  en el crecimiento bacteriano, mediante la comparación de las curvas de crecimiento entre la cepa salvaje EcN y la mutante EcN  $\Delta tolR$ . El crecimiento fue monitorizado mediante la medida de la densidad óptica y el recuento de células viables en placa (Fig. 4.15). No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de las dos cepas ensayadas, aunque a lo largo de la fase exponencial ambas bacterias mostraron una tasa de división ligeramente diferente, siendo de 23,3 minutos para la cepa mutante frente a los 19,3 de la cepa salvaje. Así pues, EcN  $\Delta tolR$  presentó un crecimiento algo más lento en las primeras horas de cultivo, pero a

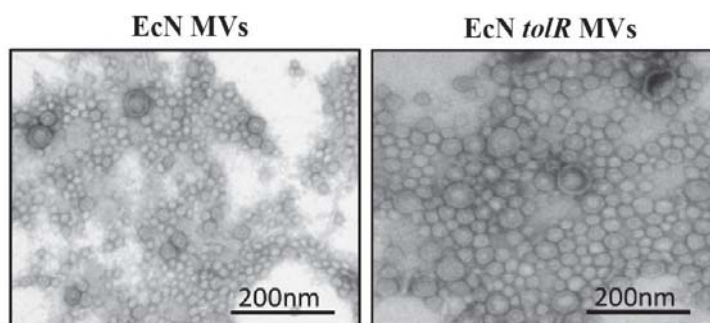
partir de las 4 h se igualaron las DO y los recuentos de células viables fueron los mismos a lo largo de la curva.



**Figura 4.15. Curvas de crecimiento de *EcN* y *EcN ΔtolR*.** Las cepas se cultivaron en matraces con LB a 37°C y 250 rpm. Las curvas fueron realizadas en dos experimentos independientes y con dos réplicas por cada uno. (A) Curva de densidad óptica y (B) curva de recuento de células viables, expresadas en unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml).

### 3.2 VALORACIÓN DEL INCREMENTO EN LA VESICULACIÓN ENTRE LA CEPA *EcN* Y *EcN ΔtolR* POR CUANTIFICACIÓN DE MVs

Para cuantificar el incremento de vesiculación de la cepa salvaje respecto a la mutante se aislaron MVs de ambas cepas y se cuantificaron midiendo la concentración de proteína, LPS y lípidos. Con este objetivo se obtuvieron MVs de cada cepa a partir de 1L de LB incubado durante 15 horas a 37°C y a 250 rpm. Las MVs sedimentadas fueron resuspendidas en 200  $\mu$ L de tampón fosfato y seguidamente se realizó una tinción negativa de cada muestra y fueron visualizadas mediante TEM. Se confirmó la presencia de vesículas en ambas suspensiones (Fig. 4.16) y se detectó una diferencia entre los diámetros de las MVs de ambas cepas. Concretamente las MVs de *EcN* presentaban un diámetro comprendido entre los 20-60 nm, mientras que las vesículas de *EcN ΔtolR* medían entre 20-150 nm.



**Figura 4.16.** Imágenes representativas de TEM de tinciones negativas de la MV de EcN y EcN  $\Delta tolR$ . Para su visualización las MVs obtenidas de la cepa EcN  $\Delta tolR$  fue diluida 1/20, mientras que las MVs de la cepa salvaje se inspeccionaron directamente.

Seguidamente, se determinó el rendimiento en la producción de MVs mediante el cálculo de proteína y LPS, normalizando los valores respecto al volumen total del cultivo. También se evaluó el contenido de lípidos asociado a MVs mediante fluorescencia utilizando el agente de tinción FM4-64. Los valores de fluorescencia relativa fueron normalizados en relación al número de bacterias en el cultivo. Los resultados de las diferentes cuantificaciones se muestran en la Tabla 4.5.

Los tres métodos utilizados revelaron diferencias significativas en la secreción de MVs, detectando un incremento de la vesiculación en la cepa EcN  $\Delta tolR$  respecto a EcN de 32,9, 51,95 y 77,78 en proteína mediante Bradford, LPS por Purpald y lípidos por fluorescencia relativa emitida por FM4-64, respectivamente.

**Tabla 4.5.** Concentraciones de proteína, LPS y lípidos de MVs de EcN y EcN  $\Delta tolR$ . Proteína expresada en mg/L de cultivo. LPS expresado en mmolKDO/L de cultivo. Lípidos expresados como RFU/CFU, siendo RFU unidades relativas de fluorescencia respecto a ucf/mL del cultivo.  $\Delta MVs$  indica el incremento de la vesiculación para cada cepa. Los valores mostrados son la media de tres experimentos independientes y su SD.

	EcN	EcN $\Delta tolR$	$\Delta MVs$
<b>Proteína</b>	0.42 $\pm$ 0.03	13.01 $\pm$ 1.42	<b>32.9*</b> $\pm$ 7.04
<b>LPS</b>	0.11 $\pm$ 0.04	5.20 $\pm$ 2.04	<b>51.95*</b> $\pm$ 29.72
<b>RFU/CFU</b>	1.16 E-03 $\pm$ 3.7 E-04	8.26 E-02 $\pm$ 8.5 $\pm$ E-03	<b>77.78*</b> $\pm$ 22.03

\*indica niveles de vesiculación significativamente diferentes estimado mediante una prueba de Krustal- Wallis ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LAS CEPAS EcN y EcN $\Delta tolR$

En las cuantificaciones anteriores se pudo observar que la relación entre las concentraciones de proteína-LPS-lípido entre la cepa mutante y la salvaje eran claramente distintas, sugiriendo que la composición de las MVs procedentes de EcN  $\Delta tolR$  era diferente a la de las MVs de EcN. Además, al detectar que las MVs de EcN  $\Delta tolR$  tenían un diámetro mayor que las procedentes de la cepa salvaje, se consideró interesante evaluar si la mutación del sistema *tol-pal* inducía cambios en la estructura de EcN y sus MVs, mediante TEM y Cryo-EM.

#### 3.3.1 Estudio estructural de EcN y EcN $\Delta tolR$ cultivadas en medio sólido mediante TEM después de HPF-FS.

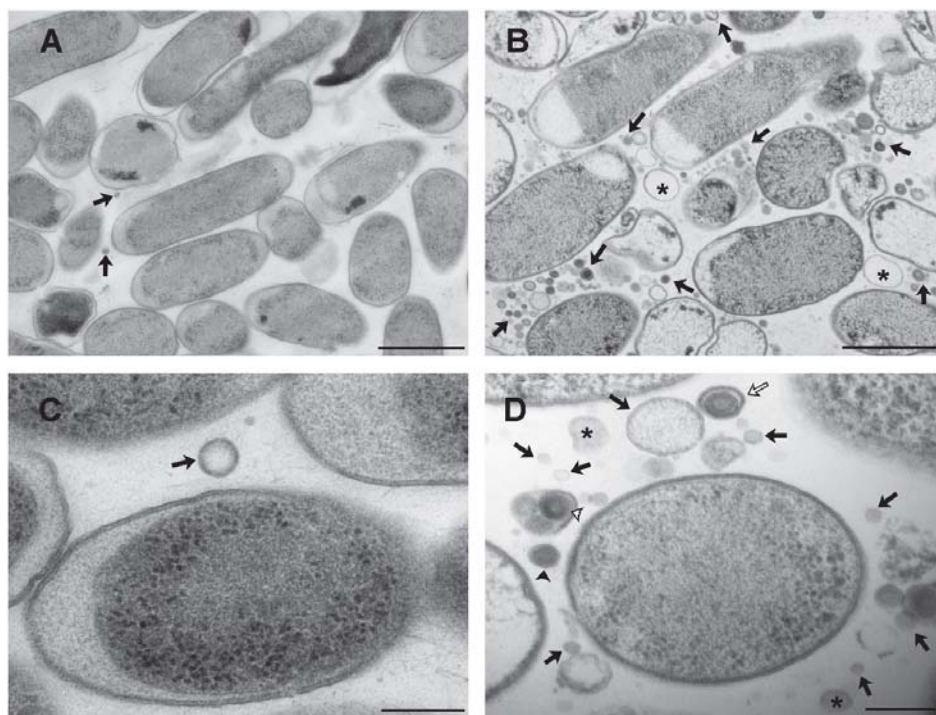
Ambas cepas fueron analizadas mediante TEM de cortes ultrafinos obtenidos después de HPF-FS. Para la preparación de las muestras las bacterias fueron cultivadas en TSA a 37°C durante 18 horas. Las observaciones mostraron importantes diferencias entre EcN y EcN  $\Delta tolR$ , en cuanto al número de MVs presentes en la matriz extracelular y a su morfología.

En los distintos campos analizados de cortes de EcN, prácticamente no se visualizaron MVs en la matriz extracelular, mientras que todas las secciones analizadas de EcN  $\Delta tolR$  presentaban un elevado número de MVs, confirmando el fenotipo hipervesiculante (Fig.4.17, A-B). Por otra parte, la estructura bacteriana de EcN estaba completamente preservada, con el citoplasma de las células distribuido homogéneamente y unas membranas bien definidas. Además, el aspecto de las bacterias en los diferentes campos analizados era similar. En cambio, la estructura de EcN  $\Delta tolR$  estaba menos preservada y presentaba diferencias morfológicas claras con la cepa EcN. Los citoplasmas de la cepa mutante eran menos compactos y uniformes y el espacio periplasmático era más ancho. De la misma manera, se detectó la presencia de bastantes células vacías, aunque se desconoce si pudieran ser consecuencia de la criofijación y criosustitución, o bien, la cepa ya estaba alterada antes de su preparación para microscopia (Fig. 4.17, A-B).

A nivel de vesículas, la morfología de las MVs secretadas por EcN  $\Delta tolR$  era muy diferente a de las MVs de EcN. En EcN se identificaron principalmente vesículas convencionales (OMVs) formadas por una sola bicapa y encapsulando material procedente del periplasma (Fig. 4.17, C). En cambio, EcN  $\Delta tolR$  se observaban distintos tipos de MVs con tamaños comprendidos entre los 20-200 nm. En las secciones de EcN



$\Delta tolR$  se observaron tanto las OMVs como las nuevas O-IMVs con una doble bicapa (Fig. 4.17 D, flechas negras). Además, se observaron vesículas que estaban formadas por tres membranas concéntricas (Fig. 4.17 D, flecha blanca) y también se visualizaron grupos de 2 o 3 vesículas rodeadas por una membrana (Fig. 4.17, D, cabeza de flecha blanca). Por otra parte, los diámetros de las MVs de  $\Delta tolR$  eran más dispersos y el rango más amplio, confirmando los resultados obtenidos previamente en las tinciones negativas. En las observaciones realizadas se detectó también la presencia de unas vesículas de un tamaño considerable ( $\sim 400$  nm) compuestas por una bicapa simple y aparentemente vacías de contenido (Fig. 4.17, D, asterisco). Por último, también se observaron en el espacio extracelular fragmentos de membranas parcialmente recircularizadas.

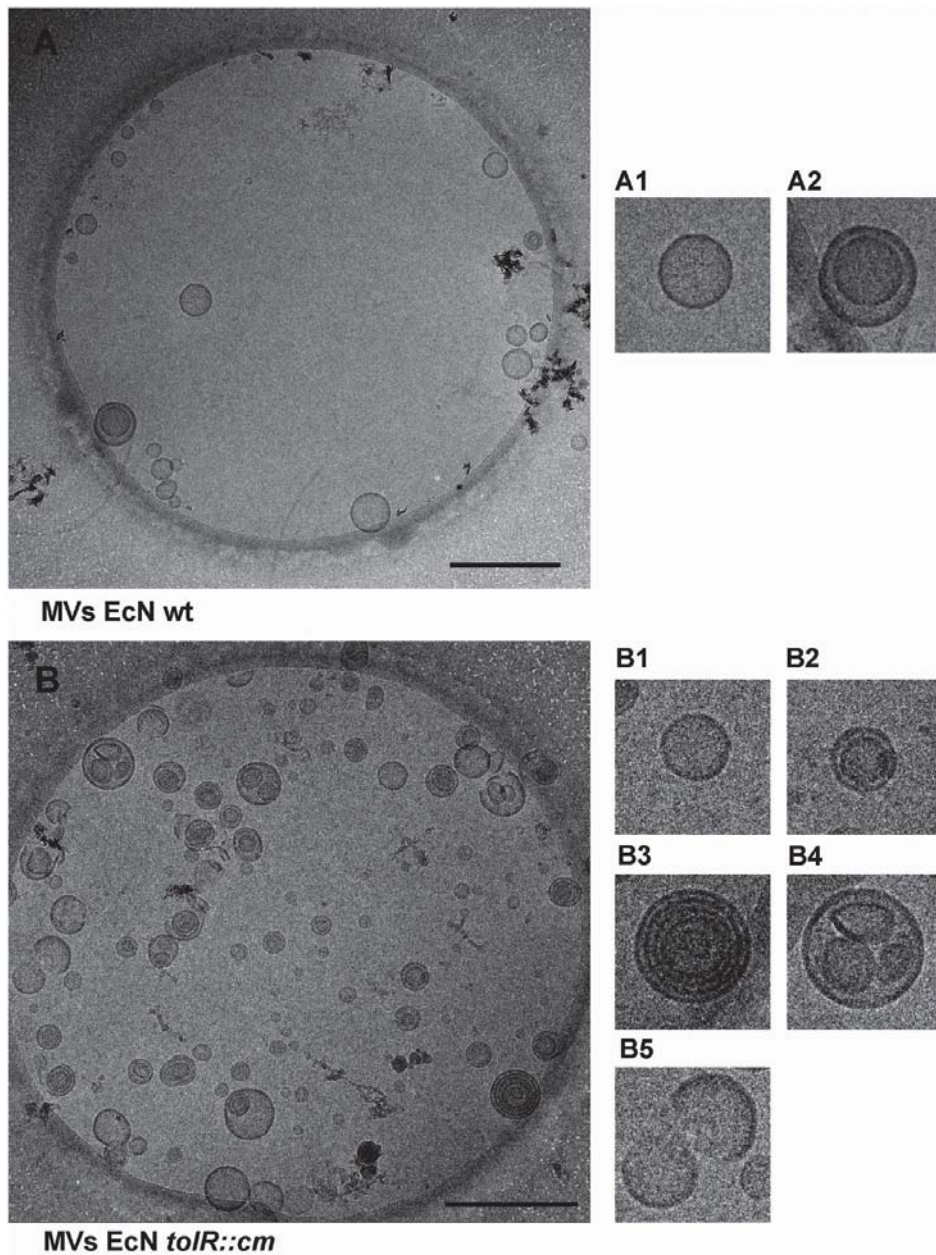


**Figura 4.17. TEM de secciones de EcN y EcN  $\Delta tolR$  procesadas por HPF-FS** (A) Imagen representativa de EcN en la que se observan muy pocas MVs (flechas) en la matriz extracelular. (B) Imagen representativa de EcN  $\Delta tolR$  con abundantes MVs (flechas). (C) Imagen ampliada de EcN en la que se observa una OMV (flecha) (D) Imagen ampliada de EcN  $\Delta tolR$  en la que se aprecian diferentes tipos de MVs: OMVs, (flechas negras); O-IMVs, (punta de flecha negra); vesícula con capas concéntricas (flecha blanca); grupo de vesículas rodeadas por una membrana (punta de flecha blanca); membranas parcialmente recircularizadas (asteriscos). Barras A-B de 1000 nm y C- D de 200 nm.

### 3.3.2 Cryo-EM de MVs de EcN y EcN $\Delta tolR$

Para caracterizar con más detalle la estructura de las MVs, éstas se analizaron mediante Cryo-EM. Para ello, las MVs se obtuvieron a partir de cultivos líquidos y las suspensiones de MVs obtenidas fueron depositadas en rejillas y criofijadas mediante PF. En las muestras de EcN (Fig. 4.18, A), las OMVs predominaron en todos los campos observados (Fig. 4.18, A1), pero también se detectaron ocasionalmente O-IMV (Fig. 4.18, A2). Sin embargo, las observaciones de MVs de EcN  $\Delta tolR$ , mostraron distintos tipos de vesículas que no se correspondían con los modelos descritos Fig. 4.18, B). Además de OMV (Fig. 4.18, B1) y O-IMV (Fig. 4.18, B2), a menudo se observaron MVs con múltiples capas (Fig. 4.18, B3), así como pequeños grupos de MVs rodeados por una bicapa (Fig. 4.18, B4) y fragmentos de membranas parcialmente circularizadas (Fig. 4.18, B5).

En conjunto, los estudios de microscopía electrónica confirmaron que las MVs producidas por la cepa EcN  $\Delta tolR$  presentaban una gran heterogeneidad a nivel estructural, no observada en las MVs de la cepa salvaje, sugiriendo que podrían tratarse de sub-productos generados por la alteración de la envuelta bacteriana de la cepa mutante.

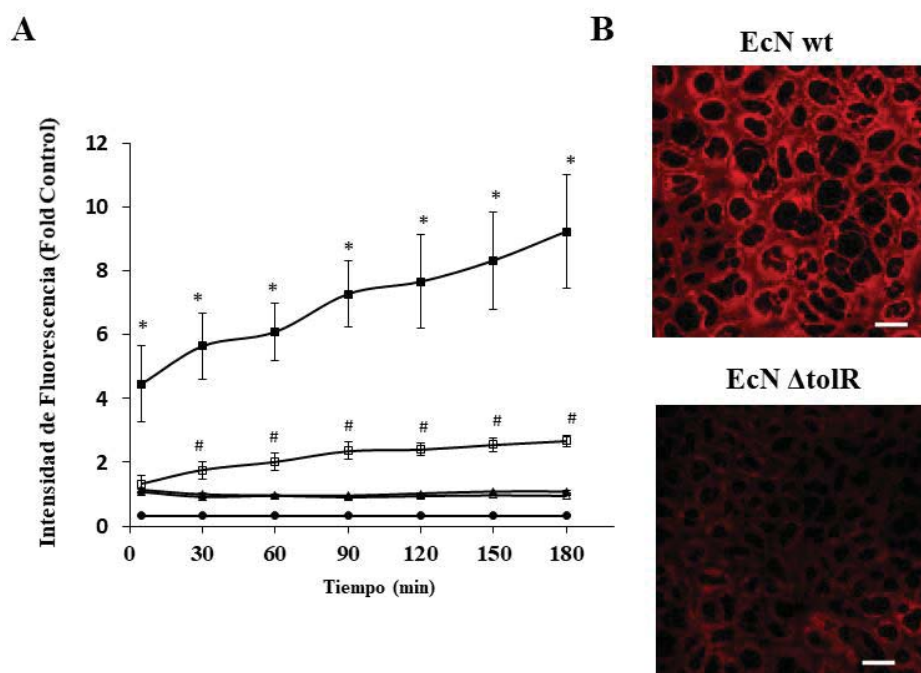


**Figura 4.18. Imágenes de Cryo-EM de MVs aisladas de *EcN* y *EcN ΔtolR*.** (A) Imagen representativa de MVs secretadas por *EcN*. Se pueden observar ambos tipos de MVs: OMVs (A1) y O-IMVs (A2). (B) Imagen representativa de las MVs de *EcN ΔtolR* y ampliaciones de los respectivos tipos vesiculares: OMVs (B1); O-IMVs (B2); MVs con múltiples capas (B3); grupo de MVs rodeadas por membrana (B4); membranas recircularizadas (B5). Imágenes representativas de 2 producciones de MVs para ambas cepas. Barra de 500 nm.

### 3.4 MEDIDA DE LA INTERNALIZACIÓN *in vitro* DE MVS DE EcN Y $\Delta tolR$ POR CULTIVOS EPITELIALES DE Caco-2

Recientemente se ha demostrado que las vesículas de EcN pueden ser internalizadas por células intestinales tipo Caco-2 (Cañas et al., 2016). Para evaluar si la presencia de distintos tipos de estructuras vesiculares en  $\Delta tolR$  podría influir en su internalización se realizó el siguiente estudio. MVs producidas por ambas cepas se aislaron y se tiñeron con el fluoróforo rodamina B-R18 (R-18) que actúa insiriéndose en las membranas lipídicas. Este fluoróforo presenta la característica particular de que cuando se encuentra a elevadas concentraciones su fluorescencia se encuentra apantallada o inhibida (“quenched”). Mientras que, al contactar con membranas, ya sea por fusión o internalización, la rodamina contenida en las membranas de la vesícula se libera y se intercala en la membrana de la célula, ejerciendo un efecto de dilución que se traduce en un incremento en la fluorescencia emitida.

Así pues, para la realización del ensayo de internalización, las células Caco-2 fueron cultivadas en placas de 96 pocillos durante 18-20 días. A partir de aquí, el medio de cultivo fue substituido por MVs marcadas con R-18 resuspendidas en medio DMEM. En cada pocillo se añadió una cantidad de MVs equivalente a 1  $\mu$ g de proteína y el incremento de fluorescencia fue monitorizado a lo largo del tiempo. Tal como esperábamos, se observó un incremento de la fluorescencia en aquellos cultivos en los que se añadieron MVs de EcN. Sin embargo, para la misma cantidad de proteína ensayada, la intensidad de señal emitida fue notablemente menor en los cultivos que contenían MVs de  $\Delta tolR$  (Fig 4.19, A). En células no tratadas con MVs marcadas o en aquellas muestras que contenían sólo MVs marcadas con R-18 sin células, no se detectaron cambios en la fluorescencia, confirmando que el incremento en la fluorescencia detectado procedía de su internalización. Posteriormente, se analizaron mediante microscopía confocal cultivos de Caco-2 que fueron expuestos a la misma cantidad de Mvs de EcN y  $\Delta tolR$  teñidas con R-18, confirmando el menor grado de captación de las MVs de  $\Delta tolR$  por parte de las células epiteliales en comparación con la cepa salvaje (Fig 4.19, B).



**Fig. 4.19. Estudio de la capacidad de internalización de las MVs obtenidas de EcN y  $\Delta tolR$ .** (A) Estudio de la cinética de internalización de vesículas de EcN teñidas con R-18 (cuadrados negros) respecto  $\Delta tolR$  (cuadrados blancos) por células Caco-2. Como control de la fluorescencia se emplearon células Caco-2 sin vesículas (círculos) y vesículas teñidas (triángulos). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se valoraron mediante el cálculo de la ANOVA seguido del test de Turkey. \* p-valor  $< 0,02$ , para células incubadas con MVs marcadas con R-18 respecto al control de vesículas solas. # p $< 0,02$ , células incubadas con MVs aisladas de  $\Delta tolR$  respecto a células incubadas con MVs procedentes de la EcN. (B) Imagen de confocal en la que se observa el incremento de fluorescencia por la internalización de MVs de EcN por células Caco-2 en comparación con MVs de  $\Delta tolR$ . Las imágenes fueron obtenidas tras una incubación de células Caco-2 con MVs marcadas con R-18 durante 1 hora y 3 horas a 37 °C y las MVs internalizadas se observan en rojo. Barras de escala: 20  $\mu$ m.

El experimento de internalización *in vitro* de MVs de EcN y  $\Delta tolR$  por cultivos epiteliales de Caco-2 fue realizado por el grupo de investigación Dra. Baldomá y Dra. Badia, y concretamente los resultados fueron recogidos en la Tesis Doctoral “*Comunicación microbiota-huesped: internalización y señalización intracelular de MVs de cepas prebióticas y comensales de E. coli en células del epitelio intestinal*” de la Dra. Maria Alexandra Cañas.

#### **4. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE RNA EN VESÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**

Una vez confirmada la secreción de las O-IMVs por bacterias gramnegativas, nos preguntamos qué otros componentes citoplasmáticos podían estar incluidos en MVs. Decidimos centrarnos en el estudio del contenido de RNA asociado a vesículas y más específicamente en el análisis de aquellos RNAs que no codifican para proteínas y que ejercen funciones reguladoras en el organismo, denominados *small* RNA (sRNA) o RNAs no codificantes (ncRNAs). Se ha observado que las vesículas extracelulares de eucariotas están enriquecidas en RNAs de pequeño tamaño y que además pueden transferirlo a células receptoras y modificar su expresión génica ejerciendo una regulación intercelular (Tkach & Théry, 2016; Waters & Storz, 2009).

El objetivo general de los siguientes apartados es confirmar la encapsulación de RNA en el interior de las MVs de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

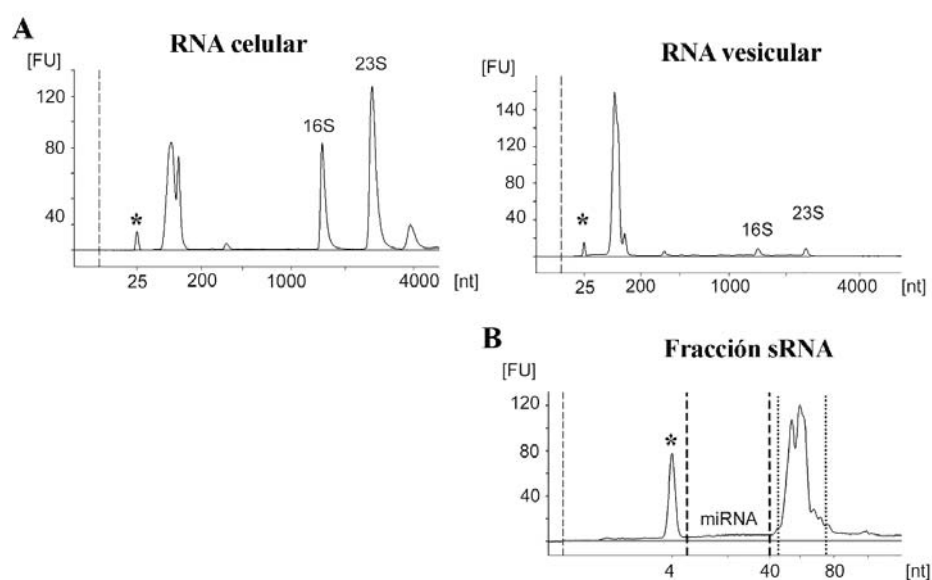
##### **4.1 ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE RNA ENCAPSULADO EN MVs EN COMPARACIÓN CON EL CELULAR EN *P. aeruginosa* PAO1.**

Inicialmente se decidió comparar los perfiles electroforéticos del RNA extraído de MVs y de células de *P. aeruginosa*, mediante el uso de Agilent 2100 Bioanalyzer, que permite la determinación del tamaño, cantidad y control de calidad de ácidos nucleicos mediante una tecnología de chip de microfluidos.

Para ello, la bacteria se cultivó en TSB irradiado hasta una DO de 1,65 (4,5 horas), que corresponde a la fase de crecimiento exponencial tardía. A continuación, se separó una alícuota del cultivo para la extracción de RNA celular, mientras que el resto fue empleado para el aislamiento de MVs a partir de los sobrenadantes de cultivo. Las MVs aisladas fueron sometidas a un tratamiento con RNAsa de 10 ng/ $\mu$ L con el fin de degradar aquel RNA que pudiera estar asociado al exterior de las vesículas. Seguidamente, las MVs se resuspendieron en agua y fueron centrifugadas para eliminar la presencia del enzima, y evitar su interferencia en posteriores experimentos.

Para la obtención del RNA se utilizó el kit comercial *miRNeasy Mini Kit*, que permite el aislamiento de RNA total juntamente con la fracción de RNA de tamaño inferior a 200 nucleótidos mediante una extracción fenol-cloroformo y posterior purificación en columna. Una vez aislado, se compararon los perfiles electroforéticos del RNA total

obtenido tanto de las células como de las MVs, mediante el uso del Bioanalyzer. Para la examinar la distribución de tamaños del RNA presente en MVs se empleó el chip de *Agilent RNA 6000 Pico*, mientras que el chip *RNA 6000 nano* se utilizó para la caracterización del perfil de RNA celular. Cabe destacar que ambos chips difieren en su sensibilidad a la hora de detectar RNA, ya que el chip de pico RNA permiten evaluar las concentraciones que están situadas en un rango de 5 - 0,05 ng/μL de RNA, mientras que el chip de nano RNA permite evaluar un rango de 5 - 500 ng/μL *Agilent RNA 6000 nano Kit*.



**Figura 4.20. Comparación de los perfiles electroforéticos mediante Bioanalyzer.** (A) Perfil de RNA celular total analizado con el chip de *RNA 6000 Nano Kit* y el RNA vesicular con el *RNA 6000 Nano Kit* y el RNA vesicular con el *RNA 6000 Pico chip*. El análisis con el Bioanalyzer nos permitió determinar la integridad del RNA celular extraído, obteniendo valor de RIN de 9,6, siendo 10 el valor máximo otorgado. (B) Análisis del RNA vesicular de menor tamaño con el chip *Agilent Small RNA kit*, observando un tamaño de RNA comprendido entre los 40 y 80 nt. (\*) Indica el patrón de RNA y siempre corresponde al primer pico que se observa en el electroferograma, y por el cual se calculan las concentraciones y tamaños de RNA de las muestras.

La comparación de ambos perfiles nos permitió visualizar claras diferencias entre los tamaños de RNA celular y vesicular (Fig 4.20, A). El RNA celular presentaba una mayor proporción de RNA ribosomal, con una presencia abundante de las fracciones 23S y 16S. En cambio, en MVs se observó un pico mayoritario situado en la zona de tamaño

comprendido entre los 25-200 nucleótidos, mientras que los picos correspondientes a rRNA eran mucho menores.

Los chips empleados no tienen la suficiente resolución para determinar el tamaño exacto de aquellos RNAs inferiores a 200 nucleótidos. Por ello, se decidió analizar el RNA vesicular con el kit de *Agilent Small RNA kit*, cuyo rango de resolución se encuentra entre los 6 y 150 nucleótidos (Fig 4.20, B). Esta técnica permitió determinar que los fragmentos de RNAs incluidos en vesículas presentaban un rango comprendido entre los 40 y 80 nucleótidos. Además, se pudo confirmar la ausencia de RNA de tamaños cercanos a los ~20 nucleótidos, donde suelen encontrarse los miRNA.

#### 4.2 CUANTIFICACIÓN DE sRNA EN MUESTRAS DE MVs

Las diferencias detectadas en la abundancia y distribución de tamaños de RNA entre las células bacterianas y sus MVs, podrían indicar que hay algún tipo de enriquecimiento selectivo de RNAs de pequeño tamaño en el interior de las MVs. Por ello, se decidió analizar detalladamente el contenido de RNA.

Uno de los puntos críticos a la hora de trabajar con RNA asociado a vesículas es su extracción y su posterior cuantificación, debido a que las cantidades obtenidas de RNA en MVs suelen ser ínfimas en comparación con las obtenidas a partir de las bacterias. Por otra parte, la composición de las membranas de las MVs difiere de la celular y por lo tanto podría estar afectando a la extracción del RNA, sobre todo a la lisis de las MVs (Eldh M et al., 2012). Por último, no existe un método estándar para la cuantificación de RNAs dentro de MVs. Por todas estas razones, se consideró necesario realizar una valoración de la extracción de RNA de MVs y una optimización de la cuantificación de sRNAs mediante una PCR a tiempo real.

##### 4.2.1 Evaluación de la extracción de RNA vesicular mediante el Kit comercial miRNAeasy de Qiagen.

Con el objetivo de valorar la idoneidad del kit comercial miRNAeasy para la obtención de RNA vesicular, se obtuvo una muestra de MVs aislada a partir de un cultivo en TSB irradiado de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, crecida hasta la fase exponencial tardía. A continuación, se realizaron diluciones seriadas de las MVs (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 o 1/32) en un volumen final de 50  $\mu$ L. Se calculó la concentración de proteína mediante Bradford

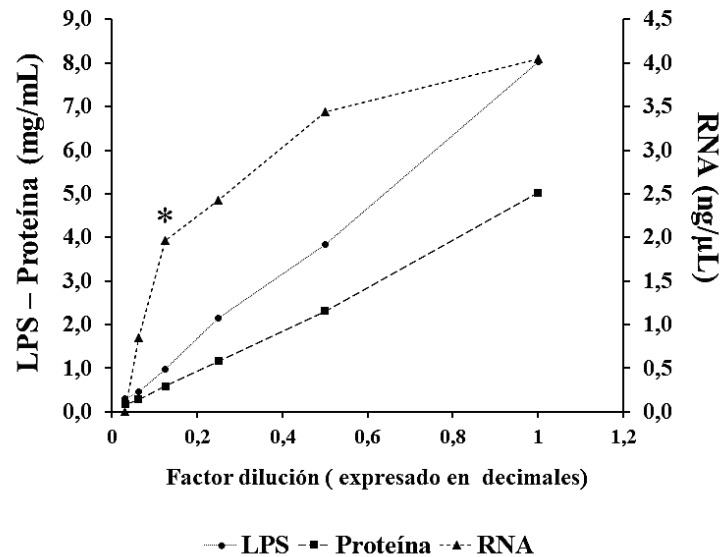


y LPS por el método de Purpald para cada dilución. Seguidamente se realizó la extracción de RNA siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo el RNA en un volumen de 30  $\mu$ L. A continuación, se evaluó la concentración de RNA mediante fluorimetría con el ensayo *Qubit RNA HS Assay Kit*. El experimento se realizó por duplicado con dos réplicas técnicas para cada experimento y los resultados se muestran en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.6. Cuantificaciones de LPS, proteína y RNA para cada dilución de MVs de *P. aeruginosa* PAO1.** Se muestra el promedio  $\pm$  desviación estándar (SD) de dos experimentos independientes, con dos réplicas cada uno. La flecha indica la dilución en la que se pierde la linealidad. No detectado, ND.

Dilución 1/	LPS (mg/ml)	Proteína (mg/ml)	RNA (ng/ $\mu$ L)
1	8,03 $\pm$ 0,42	5,02 $\pm$ 1,44	4,05 $\pm$ 0,65
2	3,85 $\pm$ 0,17	2,32 $\pm$ 0,71	3,44 $\pm$ 0,68
4	2,14 $\pm$ 0,15	1,17 $\pm$ 0,35	2,42 $\pm$ 0,20
→ 8	0,98 $\pm$ 0,07	0,59 $\pm$ 0,13	1,96 $\pm$ 0,19
16	0,46 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 0,12
32	0,30 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,00	ND

En general se observó que una mayor cantidad de vesículas, ya sea calculada mediante el LPS o proteína, comportaba la obtención de una mayor cantidad de RNA (Tabla 4.6), con un rendimiento máximo de 4,05 ng/ $\mu$ L de RNA en 30  $\mu$ L (120 ng de RNA por extracción). Los datos obtenidos fueron representados en una gráfica con el fin de visualizar la relación entre el aporte de MVs y la cantidad de RNA extraída (Fig 4.21), observando que en las suspensiones de MVs más diluidas (1/8, 1/16, 1/32) la relación RNA-LPS-Proteína se mantenía proporcional. Es decir, a un mayor aporte de MVs comportaba una mayor cantidad de RNA. Sin embargo, se observó que a partir de una cantidad concreta de MVs (Fig 4.21, asterisco) se perdía la linealidad en la concentración de RNA obtenida. Esta observación, podría indicar que la lisis incorrecta de las MVs podría limitar la cantidad de RNA extraída.



**Figura 4.21. Representación de los valores de LPS, proteína y RNA, respecto a la dilución de MVs.** Se observa que las medidas de LPS y proteína son directamente proporcionales a la dilución de MVs, mientras que la concentración de RNA pierde la linealidad a mayores concentraciones de vesículas. El asterisco en la gráfica indica el último punto en el que la extracción de RNA es lineal. Experimento realizado por duplicado, con dos determinaciones para cada punto (n=2,2).

#### 4.2.2 Cuantificación absoluta mediante RT-qPCR de small RNAs en MVs.

Una de las técnicas más empleadas para estudiar el RNA en vesículas es la RT-qPCR. Es importante tener en cuenta que esta técnica no realiza una medida directa de la concentración de RNA, ya que sólo permite evaluar la expresión de ciertos transcritos. Sin embargo, presenta una elevada sensibilidad permitiendo detectar desde 1 fg de RNA o ~ 2500 copias de un transcrito concreto en un sistema optimizado (Mateescu et al., 2017).

Una de las primeras cosas a tener en cuenta cuando se realizan determinaciones mediante RT-qPCR de muestras de RNA de MVs, es que se desconoce la existencia de un gen cuya expresión sea constante a lo largo del tiempo y como consecuencia, no se recomienda la realización de cuantificaciones relativas mediante RT-qPCR (Zhang et al., 2010). Como alternativa, se plantea el uso de cuantificaciones absolutas por RT-qPCR que permiten conocer el número exacto de copias de un transcrito mediante la extrapolación de la fluorescencia emitida a una curva. Se recomienda normalizar la expresión de los transcritos de RNA a la cantidad de MVs inicial (Mateescu et al., 2017).

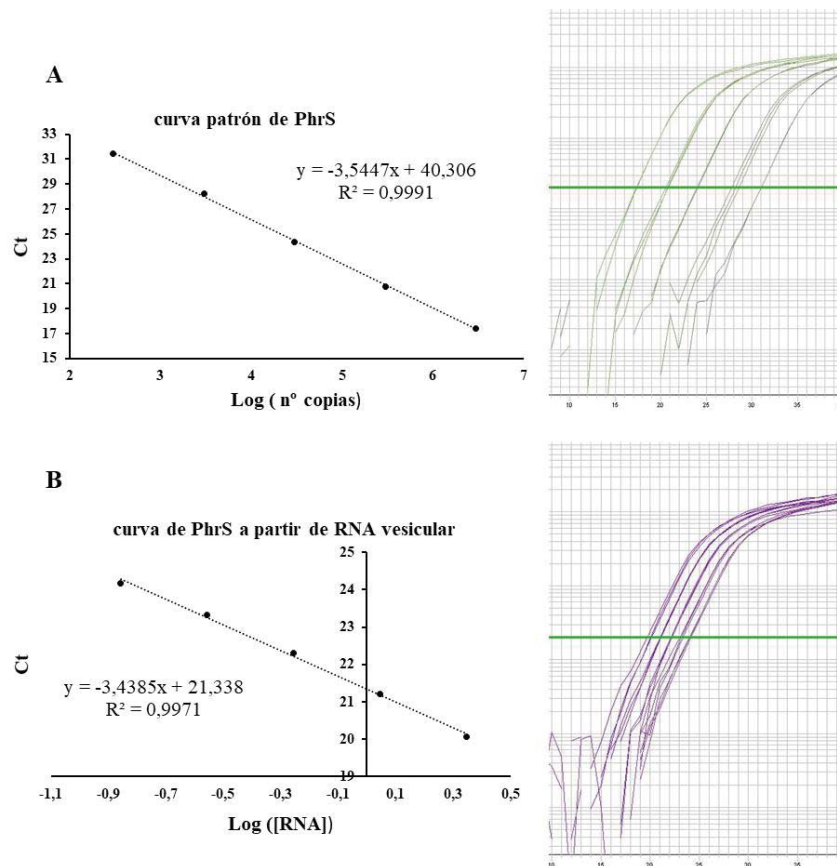
#### 4.2.2.1. Primer paso: optimización de la cuantificación absoluta mediante RT-qPCR.

Inicialmente, con el objetivo de medir la expresión de sRNAs en MVs se decidió poner a punto la cuantificación absoluta mediante RT-qPCR de tres sRNA de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PhrS, CrcZ y RsmZ), tal como se detalla en Material y Métodos (apartado 13.3). Detallamos brevemente los pasos seguidos para la optimización de la RT-qPCR para la cuantificación absoluta de sRNAs empleando la tecnología de Sybr-Green.

Inicialmente se diseñaron cebadores específicos para CrcZ y PhrS, mientras que para RsmZ se emplearon los cebadores descritos en la bibliografía (Sonnleitner & Bläsi, 2014). A continuación, se determinó la concentración óptima para cada pareja de cebadores realizando un matriz de concentraciones de los mismos. Además, se comprobó que tan sólo se generaba un producto de amplificación mediante la determinación de la *melting curve*. Seguidamente, una vez determinada las concentraciones óptimas de cada cebador para cada gen, se procedió a realizar la determinación de la eficiencia de la amplificación de la muestra y de las sondas de DNA con nuestro gen de interés (Fig 4.22). Los valores obtenidos para considerarse correctos deberían situarse entre -3.1 y -3.6, que corresponde una eficiencia de amplificación entre 110% y el 90%.

La eficiencia de la curva patrón para PhrS y CrcZ fue calculada a partir de la representación de los valores de Ct obtenidos respecto al logaritmo en base de 10 (Log10) de las diluciones seriadas ( $3 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^1$ ) de la sonda de DNA del gen de interés. Para PhrS se obtuvo un valor de -3,5 que equivale a una eficiencia del 92% mientras que para CrcZ fue de -3,6 y una eficiencia del 90% (Fig 4.22, A). Por otra parte, se determinó la eficiencia para la amplificación del RNA vesicular, partiendo de una concentración inicial de 4 ng/ $\mu$ L y realizando las diluciones 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 o 1/32. Los valores Ct fueron representados respecto al Log10 de la concentración de RNA y se calculó la pendiente de la curva, obteniendo un valor de -3,4 para PhrS que equivaldría a una eficiencia de la amplificación de 95% y para CrcZ un valor de -3,6 y una eficiencia del 90% (Fig 4.22, B).

De la misma manera se comprobó que los cebadores de RsmZ descritos en la bibliografía presentaban una eficiencia óptima para nuestras condiciones, obteniendo unos valores de -3,6, tanto para la curva patrón como para la amplificación de las muestras.



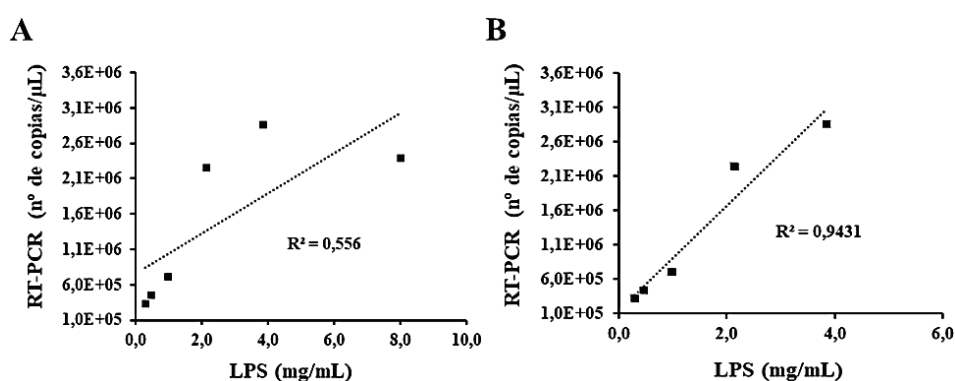
**Figura 4.22. Optimización de la cuantificación absoluta mediante RT-qPCR de sRNA de *P. aeruginosa* PAO1 empleando SYBR™ Green Master Mix para PhrS.** (A) Curva patrón de PhrS realizada a partir de las diluciones seriadas ( $3 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^1$ ) de la sonda de DNA del gen de interés. (B) Curva realizada a partir de la dilución de la muestra de RNA vesicular partiendo de una concentración inicial de 4 ng/ $\mu$ L realizando las diluciones 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 o 1/32. Los valores Ct fueron representados respecto al Log10 de la concentración de RNA y se calculó la pendiente de la curva. Los datos fueron obtenidos de dos experimentos independientes con dos réplicas técnicas para cada experimento (n=2,2).

#### 4.2.2.2. Segundo paso: cuantificación de sRNAs de diluciones de MVs.

Con la finalidad de determinar si la cantidad de RNA extraído es proporcional a la cantidad de MVs, realizamos la RT-qPCR de las muestras de RNA extraídas de las diluciones seriadas de MVs (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, o 1/32) realizadas en el apartado 5.2.1. Los valores de Ct obtenidos para cada dilución fueron extrapolados a la curva patrón para conocer el número de copias de cada sRNAs asociado a MVs. A continuación,

los valores obtenidos fueron representados en función del aporte de MVs inicial, determinado por la cantidad de LPS (Fig 4.23).

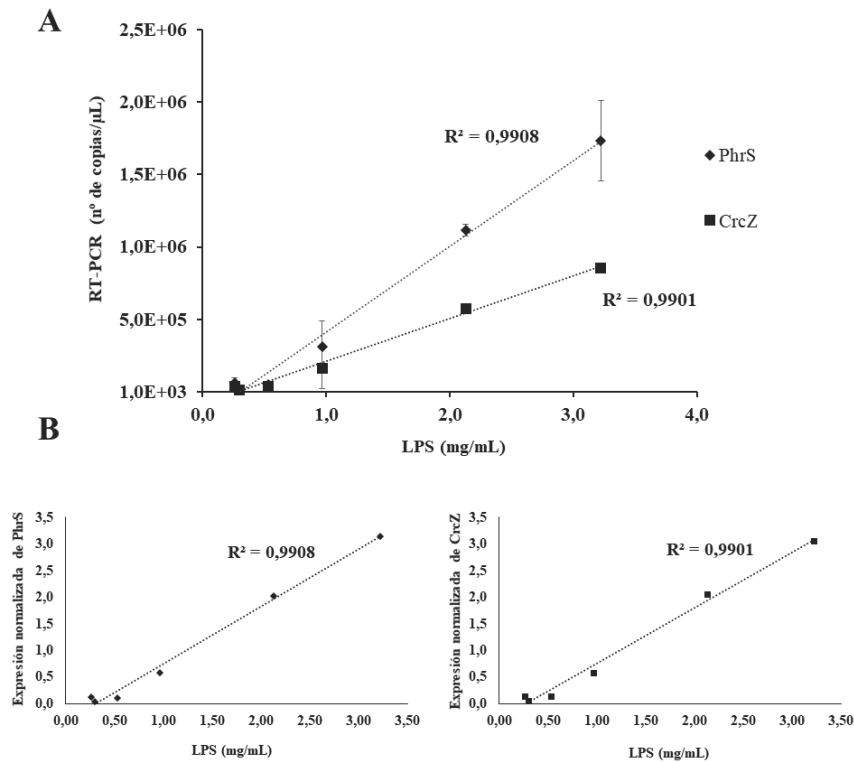
Tal como esperábamos, a mayor cantidad de MVs se detectaba mayor número de copias del gen valorado. Sin embargo, una concentración de MVs superior a 4 mg/ml de LPS en un volumen de 50  $\mu$ L (100  $\mu$ g de LPS), no comportaba un incremento en la señal del RNA detectado, perdiendo así la linealidad de la extracción (Fig. 4.23, A). Al eliminar el punto más extremo, correspondiente a un mayor aporte de MVs, se reinstauraba la proporcionalidad MVs-RNA (Fig 4.23, B).



**Figura 4.23. Optimización de la cuantificación absoluta de sRNA en MVs.** RT-qPCR del RNA extraído de la serie de diluciones de MVs (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, o 1/32). Se representa el número de copias de PhrS cuantificada para cada dilución de MVs, respecto a la cantidad el LPS correspondiente. (A) Representación que incluye todas las diluciones de MVs realizadas. Se puede observar que aquellas muestras de MVs que se encuentran entre un rango de 0,3 a 4 mg/mL de LPS mantienen una relación lineal, mientras que el punto con mayor aporte de MVs no comporta un incremento proporcional del número de copias ( $R^2 \sim 0.5$ ). (B) La eliminación del punto más extremo y con mayor cantidad de vesículas (LPS) conlleva el restablecimiento de la linealidad con una  $R^2 \sim 0.9$ .

#### 4.2.2.3 Tercer paso: verificación de la optimización de la cuantificación de sRNA en MVs mediante RT-qPCR.

Con el fin de confirmar los resultados anteriores y establecer un rango en el cual la cuantificación mediante RT-PCR fuera directamente proporcional a la cantidad de MVs, se volvió a repetir el experimento empleando esta vez una concentración inicial de MVs de 3,5 mg/ml en un volumen de 50  $\mu$ L (175  $\mu$ g de LPS). Para ello, la suspensión de MVs fue sometida a una serie de diluciones (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 o 1/32) y para cada dilución, se extrajo el RNA y seguidamente se realizó la RT-qPCR. Paralelamente se determinó la concentración de LPS y proteína de las muestras,



**Figura 4.24. Validación del método de normalización de la expresión de sRNA respecto al contenido de LPS total en MVs.** La disminución en la cantidad de MVs comporta una disminución proporcional del número de copias con una  $R^2 \sim 1$ . (A) Representación del número de copias de los sRNAs PhrS y CrcZ respecto a la cantidad de LPS. (B) Representación individualizada de cada sRNA donde la expresión fue normalizada respecto al promedio de los valores de expresión de todos los puntos ( $n=2,2$ )

Como en los apartados anteriores, el número de copias de sRNA fue representado en función de la cantidad inicial de MVs, observando que una disminución de MVs comportaba una disminución proporcional del número de copias con una  $R^2 \sim 1$  (Fig. 4.24, A). Para descartar que la linealidad viniera dada por una diferencia en la expresión entre puntos muy grande, todos los valores fueron normalizados respecto a un valor medio de expresión, calculado a partir del promedio del número de copias de todos los valores obtenidos para cada gen (Fig 4.24, B), confirmando la relación lineal existente entre el RNA y MVs, en un rango de MVs comprendido entre los 0,5 y 3,5 mg/mL de LPS.

Así pues, el resultado permitió confirmar que el método de normalización de la expresión de sRNAs respecto al aporte inicial de MVs era correcto. Además, permitió establecer una cantidad de MVs a partir de la cual se perdía la linealidad ( $> 4$  mg/mL en 50  $\mu$ L). Al

mismo tiempo, permitió establecer que cantidad mínima de MVs se necesita para cuantificar el RNA. Asimismo, se decidió que en los experimentos posteriores, los valores de expresión de RNA en MVs serían normalizados respecto al contenido de LPS en vez de proteína, porque a pesar de obtener el mismo resultado (dato no mostrado), la cuantificación de proteína se puede ver afectada por la presencia de otros componentes presentes en los sobrenadantes de los cultivos y sedimentados junto a las MVs (flagelo, macrocomplejos protéicos, profagos, proteínas del medio de cultivo). Sin embargo, el LPS al ser una medida de membrana externa, es un parámetro más específico para cuantificar MVs.

Como conclusión de este apartado de optimización, se decidió aislar el RNA a partir de una cantidad fija de MVs de 80  $\mu\text{g}$  de LPS y así facilitar la comparación entre experimentos.

#### **4.3 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE RNA EN EL INTERIOR DE LAS MVs DE *P. aeruginosa* PAO1 MEDIANTE UN ENSAYO DE RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON RNAsa**

Con el fin de determinar si este RNA se encuentra confinado en el interior de las MVs, se realizó un ensayo de protección frente a un tratamiento externo con el enzima RNAsa (*RNase protection assay*). Se considera que si el RNA está interiorizado en MVs y por lo tanto rodeado por una membrana lipídica, éste debe ser resistente a la acción de la RNAsa.

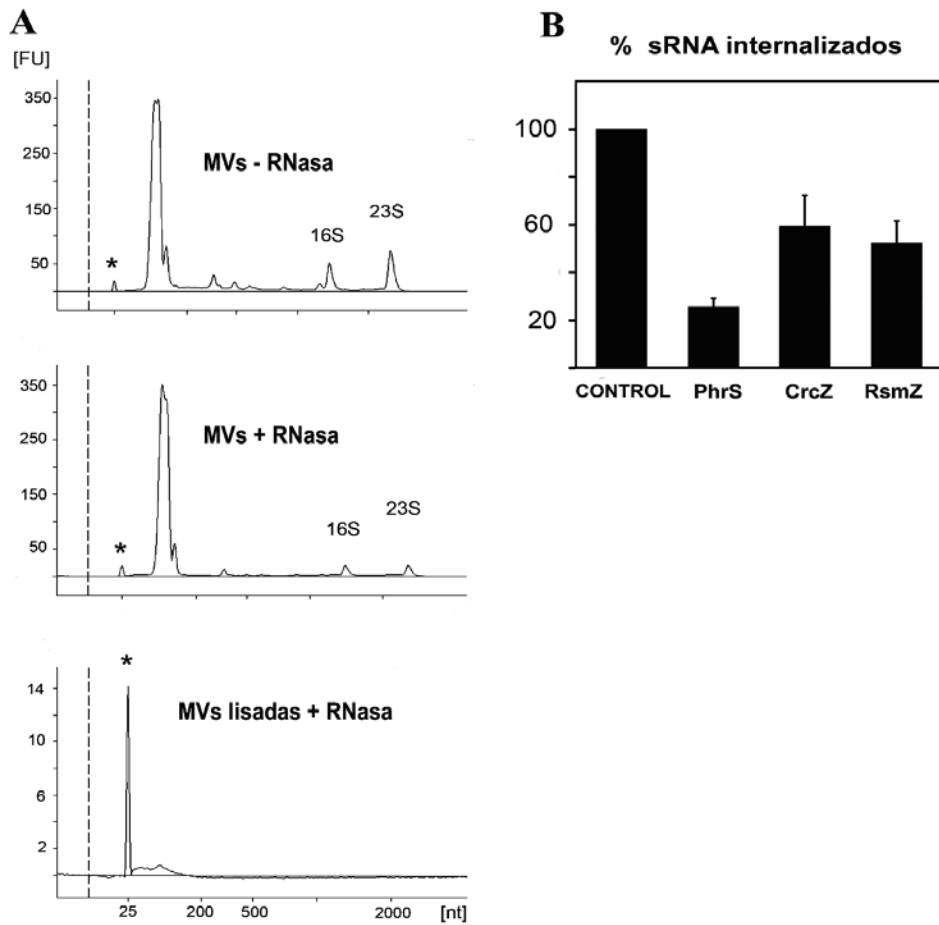
Para ello, una misma muestra de MVs de *P. aeruginosa* PAO1 aisladas a partir de 1,5 L de sobrenadante se dividió en tres alícuotas y cada una de ellas fue procesada como se describe a continuación. La primera alícuota recibió un tratamiento externo con RNAsa, la segunda alícuota fue lisada con el detergente Tritón X-100 a 0,125% y posteriormente tratada con RNAsa. La tercera alícuota fue utilizada como control y por lo tanto, no recibió tratamiento alguno. A continuación, se extrajo el RNA de 70  $\mu\text{g}$  de LPS y se compararon los perfiles electroforéticos mediante Bioanalyzer empleando el *RNA 6000 pico chip*. El experimento fue realizado en tres experimentos independientes con dos replicas técnicas para cada uno (n=3,2).

Se detectó la presencia de RNA tanto en las MVs tratadas externamente con RNAsa como en su control, mientras que en aquellas vesículas que recibieron un tratamiento de lisis y posterior tratamiento con RNAsa no se pudo visualizar la presencia de RNA mediante el Bioanalyzer (Fig 4.25, A). También se observaron ciertas diferencias entre las MVs

tratadas externamente y las MVs control, ya que estas últimas mostraban una mayor proporción de las fracciones 16S y 23S, junto con una mayor abundancia en RNA de fragmentos de tamaño de 200-100 nt. Así pues, se confirmó que el RNA se encontraba interiorizado en las MVs y protegido de la acción de enzimas degradativos, y que además las MVs presentaban una cierta cantidad de RNA extracelular asociado.

Para cuantificar la proporción de RNA interiorizado en MVs, se realizó una cuantificación de RNA total de las muestras anteriores mediante Qubit-HS, obteniendo unos valores de encapsulación del  $64\% \pm 16$ . Además, para determinar si los diferentes sRNA estaban mayormente encapsulados en el interior, se realizó una cuantificación de los tres sRNA de *P. aeruginosa* PAO1 (RsmZ, CrcZ y PhrS) mediante RT-qPCR. Los resultados obtenidos mostraron un diferente grado de encapsulación en función del sRNA (Fig 4.25, B). CrcZ y RsmZ presentaron unos valores de encapsulación cercanos al 60%, mientras que para PhrS sólo representó el ~25% del total detectado.





**Figura 4.25.** Estudio de la encapsulación del RNA en MVs de *P. aeruginosa* PAO1. (A) Perfiles electroforéticos del RNA aislado a partir de muestras de MVs: muestra control sin tratar, muestra de MVs tratadas externamente con RNAsa y muestra de MVs lisadas y tratadas posteriormente con RNAsa. (B) Evaluación de la proporción de RNA encapsulado en vesículas, mediante el cálculo por RT-PCR del número de copias de 3 sRNAs en vesículas, antes y después de un tratamiento externo con RNAsa. En la gráfica se observa la media y SD de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno. (n=3,2)

#### 4.4 ESTUDIO COMPARATIVO MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DEL RNA AISLADO DE MVs Y CÉLULAS DE *P. aeruginosa* PAO1

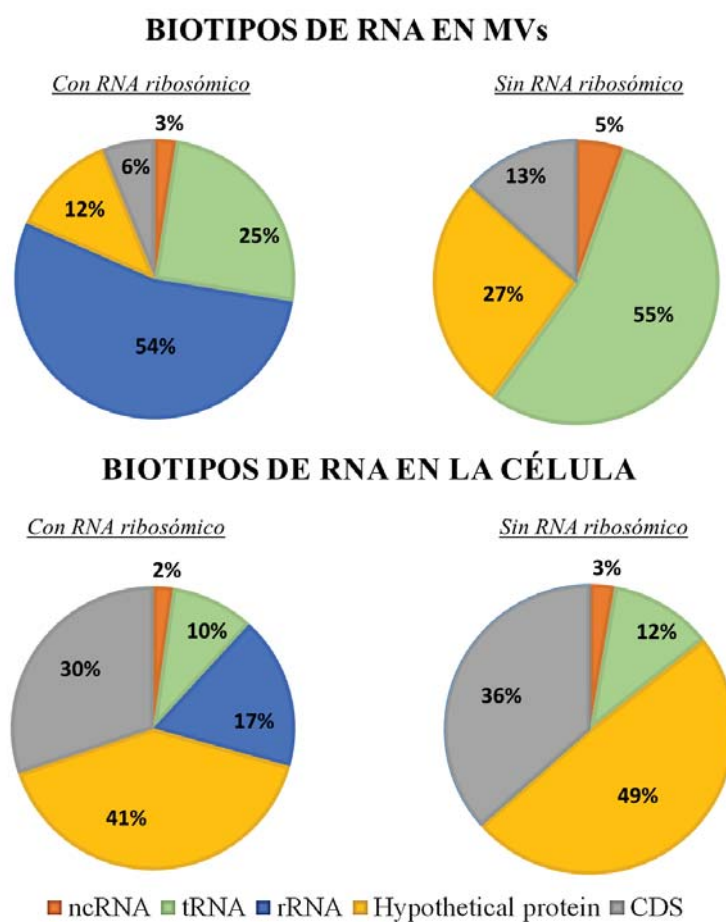
La comparación de los perfiles electroforéticos de RNA analizados mediante Bioanalyzer revelaron una distribución de RNA completamente distinta entre las muestras de RNA celular y RNA contenido en MVs en *P. aeruginosa* PAO1, mostrando que el RNA vesicular estaba prácticamente desprovisto de RNA ribosomal en comparación con el de la célula (Fig 4.20). Además, las MVs contenían principalmente transcritos de tamaño comprendido entre los 40-80 nt. A partir de esta observación, se decidió realizar una secuenciación masiva de los sRNA (RNA-seq) para determinar la naturaleza del RNA encapsulado y profundizar en las posibles diferencias entre la bacteria y sus MVs.

Con éste fin, se aislaron 3 muestras independientes de MVs procedentes de cultivos de TSB crecidos hasta una DO de 1,6. Las MVs una vez aisladas, se trataron externamente con RNAsa y se procedió a la extracción del RNA. Para la preparación de la librería se requiere una cantidad mínima inicial de 100 ng en un volumen máximo de 5µL. Por lo tanto, el RNA vesicular diluido en 30 µL de agua fue concentrado hasta un volumen de 5 µL y todo el volumen fue utilizado para la preparación de la librería. Previo al aislamiento de las MVs, se separaron dos alícuotas del cultivo bacteriano para la extracción del RNA celular y se empleó 1 µL para la preparación de la librería.

Las muestras fueron secuenciadas por triplicado y las librerías fueron preparadas con el kit *NEBNext® Small RNA Library Prep Set for Illumina®*. Éstas fueron secuenciadas *paired-end* mediante el secuenciador HiSeq 2500 System (Illumina) generando fragmentos de 50 o 75 pb (2x50//2x75pb). Se obtuvieron alrededor de 1 millón de secuencias en cada librería. Después de realizar el control de calidad y la eliminación de los adaptadores, las secuencias fueron alineadas y mapeadas contra el genoma de *Pseudomonas aeruginosa*, identificando alrededor de 5000 genes. Los elementos identificados fueron comunes para las 6 librerías, aunque estaban presentes en diferente proporción.

Se analizaron los biotipos en función de la abundancia de secuencias (Fig 4.26), observando que las MVs mostraban una mayor presencia de rRNA (54%), mientras que en las células era alrededor del 17%. Esta diferencia podría ser generada debido al procesamiento de las librerías de sRNAs, ya que se realizaron de forma distinta entre el RNA celular y vesicular. Generalmente, cuando se parte de RNA celular, al presentar una

mayor proporción de RNA ribosómico, se realiza un paso de purificación de RNA más pequeños, descartando los fragmentos mayores procedentes del rRNA. En el caso de las MVs, al tener tan poco RNA de partida y al estar en menor proporción el RNA ribosómico, se eliminó este paso con el fin de garantizar que hubiera la suficiente cantidad de RNA para secuenciar.



**Fig 4.26.** Diagrama que muestra las distintas proporciones de los correspondientes biotipos de RNA detectados en las librerías procedentes de muestras de vesículas y de células.

Varios estudios realizados tanto en eucariotas como en procariotas, durante el análisis bioinformático excluyen explícitamente la presencia del RNA ribosómico de las muestras (Buck et al., 2014; Turnbull et al., 2016). En este escenario, el biotipo más abundante en MVs fueron los tRNA (55%), seguidos por elementos que codifican para proteínas (13%)

---

(CDS) y por último ncRNA (5%). En cambio, para las células los biotipos mayoritarios correspondieron a 36% de CDS, 12% de tRNAs y por último ncRNA (5%). Cabe destacar que tanto en MVs como en células se detectaron un elevado número de secuencias que se alineaban con regiones no caracterizadas del genoma de PAO1, concretamente un 27% en MVs frente al 49% en células. Por otra parte, se detectaron ncRNA (sRNA) aunque en una baja proporción, probablemente debido al bajo número de sRNA conocidos hasta al momento

También se comparó a nivel cualitativo la media del número de secuencias detectadas en MVs y en células, observando que ambas muestras presentaban una distribución distinta de los transcritos más abundantes (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7. Lista de comparación de expresión en bacteria y MVs de los 20 transcritos con mayor número de secuencias detectadas.** Se detalla el identificador del gen, el biotipo y el número de secuencias detectadas por cada gen en las células o en la MVs. CDS (secuencia codificadora proteína) HyP (Proteína hipotética), tmRNA (fragmento derivado de un tRNA).

<i>Genes más expresados en Bacteria</i>				<i>Genes más expresados en MVs</i>			
Id Gen	Biotipo	Célula	MVs	Id Gen	Biotipo	MVs	Célula
1	PA5525	31203,0	104,7	1	PA0729.1	15367,7	1021,7
2	PA3492	30987,3	97,0	2	PA3139.1	14407,7	4926,7
3	PA2416	30574,0	97,3	3	PA4277.2	10690,0	3747,3
4	PA3305.1	12020,0	759,0	4	PA3094.2	10270,3	424,7
5	PA0668.2	11008,0	9300,7	5	PA3094.1	10260,3	424,7
6	PA1414	8726,0	1697,0	6	PA3262.1	10211,0	421,3
7	PA1796.3	8086,0	4354,3	7	PA0826.2	9979,0	5872,0
8	PA3181	8058,7	437,7	8	PA0668.2	9300,7	11008,0
9	PA4277.1	7602,0	2406,7	9	PA4746.2	9055,0	464,7
10	PA5149.1	7087,7	2293,3	10	PA3133.2	8146,3	4947,7
11	PA2775.1	6832,3	5827,3	11	PA0622	8075,7	415,3
12	PA3327	6596,0	89,0	12	PA3133.4	8029,3	4989,7
13	PA1939	6376,7	263,3	13	PA1013.1	7465,3	3137,0
14	PA0826.2	5872,0	9979,0	14	PA1796.2	6047,0	5794,3
15	PA1796.4	5816,0	6041,0	15	PA1796.4	6041,0	5816,0
16	PA1796.2	5794,3	6047,0	16	PA2736.1	6040,3	933,7
17	PA4524.1	5411,0	2218,7	17	PA4937.2	5857,3	3031,3
18	PA0242	5141,0	18,0	18	PA2775.1	5827,3	6832,3
19	PA0668.3	5106,7	947,3	19	PA4937.1	5791,0	3076,7
20	PA3133.4	4989,7	8029,3	20	PA3031.1	5067,0	2872,7

A continuación, se procedió a la normalización de las muestras y al cálculo de la expresión diferencial entre las muestras de MVs y de las células. Sólo se tuvieron en cuenta aquellos genes que presentaban un número de secuencias detectadas mayor a 100 y un FDR (False *Discovery Rate*) <0,01, identificando alrededor de 300 genes diferencialmente expresados con un Log<sub>2</sub> Fold-Change >1,5. Este parámetro representa el incremento o disminución en el número de secuencias detectadas en MVs para un determinado gen, respecto al número detectado en las células. Es decir, indica la intensidad del cambio en la expresión, a mayor Log<sub>2</sub> Fold-Change mayor es la diferencia entre muestras,

Se identificaron un total de 68 RNAs que estaban expresados diferencialmente con un Log<sub>2</sub>-FC > 4. Concretamente, 45 genes estaban más expresados en MVs (Tabla 4.8, Log<sub>2</sub>-FC verde) frente a 23 genes más expresados en la bacteria (Tabla 4.8, Log<sub>2</sub>-FC rojo). La mayoría de los RNAs identificados correspondían a tRNAs (Tabla 4.8). Además, se observó la presencia de los sRNA RsmZ y RsmY, mientras que otros sRNA como CrcZ y PhrS presentaron unos valores de Log<sub>2</sub>-FC menores, concretamente de 1,07 y -1,078 respectivamente (no incluidos en la Tabla 4.8). También, se confirmó la presencia de RNAs que ya habían sido previamente identificados en muestras de MVs de *P. aeruginosa*, recogidos en el estudio realizado por Turnbull y colaboradores (2016).

**Tabla 4.8. Lista de RNAs identificados con un log<sub>2</sub>-FC>4 o log<sub>2</sub>-FC<-4.** En verde se resaltan aquellos RNAs que se encuentran más expresados en MVs respecto a las células, mientras que en rojo se resaltan aquellos RNAs más expresados en las células. En negrita se indican los sRNAs que han sido identificados en la RNA-seq realizada por Turnbull et al., 2016.

	ID	Counts	log2FC	Biotipo	Descripción
1	PA3262.1	14330,68	<b>7,49</b>	tRNA	tRNA -Asp
2	PA3094.2	14361,02	<b>7,48</b>	tRNA	tRNA -Asp
3	PA3094.1	14317,78	<b>7,47</b>	tRNA	tRNA -Asp
4	PA4746.2	12048,20	<b>7,17</b>	tRNA	tRNA -Leu
5	<b>PA0911</b>	2113,82	<b>6,90</b>	CDS	Hypothetical Protein
6	PA0729.1	20179,95	<b>6,77</b>	tRNA	tRNA -Gly
7	PA1804.1	5464,02	<b>6,69</b>	tRNA	tRNA -Asp
8	<b>PA0910</b>	486,08	<b>6,59</b>	CDS	Hypothetical Protein
9	PA2098	1629,99	<b>6,42</b>	CDS	Probable Esterase/Deacetylase
10	PA0348	699,08	<b>5,58</b>	CDS	Hypothetical Protein
11	PA4596	897,27	<b>5,54</b>	CDS	Probable Transcriptional Regulator

---

12	PA2736.1	8393,42	5,54	tRNA	tRNA -Pro
13	PA0800	191,09	5,45	CDS	Hypothetical Protein
14	PA2819.1	5845,50	5,45	tRNA	tRNA -Gly
15	<b>PA0807</b>	669,37	5,45	CDS	N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase (ampdh3)
16	PA3933	1598,32	5,44	CDS	Probable Choline Transporter
17	PA2583.1	5691,41	5,43	tRNA	tRNA -Gly
18	PA2819.2	5744,16	5,42	tRNA	tRNA -Gly
19	PA2581.1	1786,82	5,42	tRNA	tRNA -Cys
20	PA0531	219,33	5,36	CDS	Probable Glutamine Amidotransferase
21	<b>PA0909</b>	204,62	5,31	CDS	Hypothetical Protein
22	PA1592	462,04	5,27	CDS	Hypothetical Protein
23	PA2132	194,29	5,12	CDS	Chaperone Cupa5 (cupa5)
24	PA0905.1	2344,28	5,10	tRNA	tRNA-Ser
25	PA3621.1	4153,26	4,91	ncRNA	<b>Rsmz</b>
26	<b>PA3866</b>	2563,44	4,90	CDS	Pyocin Protein
27	PA4905	191,90	4,84	CDS	Vanillate O-Demethylase Oxidoreductase
28	PA2972	210,51	4,71	CDS	Conserved Hypothetical Protein
29	PA0922.1	5060,85	4,69	tRNA	tRNA -Met
30	PA4541.2	2234,97	4,61	tRNA	tRNA -Pro
31	PA4277.3	6075,52	4,59	tRNA	tRNA -Tyr
32	PA4746.1	4215,07	4,56	tRNA	tRNA -Met
33	PA3139.1	22493,39	4,53	tRNA	tRNA -Asn
34	PA0527.1	4685,21	4,51	ncRNA	<b>Rsmv</b>
35	PA4277.2	15491,97	4,47	tRNA	tRNA -Gly
36	PA3496	177,23	4,44	CDS	Hypothetical Protein
37	<b>PA0808</b>	115,13	4,43	CDS	Hypothetical Protein
38	PA4393	738,98	4,42	CDS	Permease (Ampg)
39	<b>PA0908</b>	226,86	4,40	CDS	Hypothetical Protein
40	<b>PA0907</b>	190,42	4,39	CDS	Hypothetical Protein
41	PA2876	169,31	4,39	CDS	Orotidine 5'-Phosphate Decarboxylase (pyrf)
42	<b>PA0985</b>	580,31	4,38	CDS	Pyocin S5 (pyos5)
43	PA4541.3	4056,75	4,36	tRNA	tRNA -Asn
44	PA1013.1	10998,22	4,23	tRNA	tRNA -Ser
45	PA4802.1	201,35	4,17	tRNA	tRNA -Sec

---

---

46	PA1167	217,72	<b>-4,08</b>	CDS	Hypothetical Protein
47	PA0935	534,31	<b>-4,38</b>	CDS	Conserved Hypothetical Protein
48	PA3037	352,02	<b>-4,39</b>	CDS	Hypothetical Protein
49	PA2013	139,75	<b>-4,39</b>	CDS	Putative 3-Methylglutaconyl-Coa Hydratase (liuc)
50	PA2488	346,32	<b>-4,40</b>	CDS	Probable Transcriptional Regulator
51	PA5383	345,10	<b>-4,43</b>	CDS	Conserved Hypothetical Protein
52	PA2325	346,16	<b>-4,44</b>	CDS	Hypothetical Protein
53	PA4831	343,58	<b>-4,50</b>	CDS	Probable Transcriptional Regulator
54	PA1326	345,58	<b>-4,58</b>	CDS	Threonine Dehydratase C Biosynthetic (ilva2)
55	PA3316	341,26	<b>-4,61</b>	CDS	Probable Permease of ABC Transporter
56	PA0850	340,51	<b>-4,66</b>	CDS	Hypothetical Protein
57	PA5116	347,90	<b>-4,67</b>	CDS	Probable Transcriptional Regulator
58	PA0346	148,54	<b>-4,67</b>	CDS	Hypothetical Protein
59	PA4610	516,32	<b>-4,69</b>	CDS	Hypothetical Protein
60	PA1666	362,04	<b>-4,78</b>	CDS	Hypothetical Protein
61	PA3329	464,90	<b>-4,90</b>	CDS	Hypothetical Protein
62	PA3289	348,08	<b>-4,95</b>	CDS	Hypothetical Protein
63	PA0242	877,80	<b>-5,09</b>	CDS	Hypothetical Protein
64	PA5525	5292,98	<b>-5,33</b>	CDS	Probable Transcriptional Regulator
65	PA2416	5185,04	<b>-5,37</b>	CDS	Periplasmic Trehalase Precursor (trea)
66	PA3492	5244,56	<b>-5,40</b>	CDS	Conserved Hypothetical Protein
67	PA4118	748,36	<b>-5,90</b>	CDS	Hypothetical Protein
68	PA1303	520,27	<b>-6,76</b>	CDS	Probable Signal Peptidase

---



#### 4.4.1. Validación de la RNA-seq.

Los resultados de la RNA-seq fueron validados mediante RT-qPCR empleando los genes *crcZ*, *phrS* y *rsmZ*. Para ello, se realizaron cuantificaciones absolutas del RNA procedente de muestras de MVs y de células obtenidas independientemente de las empleadas para la transcriptómica. Los resultados se muestran en la Tabla 4.9.

**Tabla 4.9 Validación de los datos obtenidos en la RNA-seq mediante RT-qPCR de MVs y de células.** En la tabla se indica los valores obtenidos en la RT-qPCR para cada sRNA en muestras de MVs y células. Además, se indica la relación que existe entre las MVs y células para cada sRNAs (Ratio MVs/C), calculada mediante RT-PCR. También se indica el Log<sub>2</sub>-FC obtenido del análisis estadístico de la RNA-seq.

	Expresión sRNA mediante RT-qPCR		Ratio RT-qPCR (MVs/C)	Log <sub>2</sub> FC RNA-seq (MVs/C)
	MVs (n° copias/ μg LPS)	Célula (C) (n° copias/ ng DNA)		
<b>PhrS</b>	4,96 x 10 <sup>5</sup> ± 5,77 x 10 <sup>5</sup>	3,03 x 10 <sup>6</sup> ± 1,65 x 10 <sup>5</sup>	<b>0,16</b>	<b>-1,078</b>
<b>CrcZ</b>	2,25 x 10 <sup>5</sup> ± 1,19 x 10 <sup>5</sup>	3,33 x 10 <sup>5</sup> ± 1,86 x 10 <sup>5</sup>	<b>0,67</b>	<b>1,07</b>
<b>RsmZ</b>	7,85 x 10 <sup>5</sup> ± 1,82 x 10 <sup>5</sup>	1,63 x 10 <sup>4</sup> ± 1,23 x 10 <sup>4</sup>	<b>46,37</b>	<b>4,91</b>

La relación entre los tres sRNAs contenidos en MVs respecto al RNA celular fue calculada por RT-qPCR, confirmando que el sRNA menos “enriquecido” en vesículas respecto a la célula era PhrS y el que más enriquecido RsmZ.

#### 4.5. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE sRNAs EN MVs EN DISTINTAS ETAPAS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.

En estudios de transcriptómica de *P. aeruginosa* se ha demostrado que las bacterias que se encuentran en fase exponencial presentan un patrón de expresión génica similar al expresado durante el estado de vida libre, mientras que la bacteria en la fase estacionaria presenta un patrón similar al expresado durante la fase de biofilm (Dötsch et al., 2012), y la transición entre estos dos estados viene regulada por el QS bacteriano. En este escenario, se propuso caracterizar el contenido de sRNAs en MVs respecto al celular a lo largo de una curva de crecimiento de *P. aeruginosa*, con el fin de evaluar si las MVs podrían estar mediando procesos de comunicación bacteriana mediante la transferencia de sRNAs

#### 4.5.1 Caracterización de la vesiculación en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a lo largo del crecimiento bacteriano.

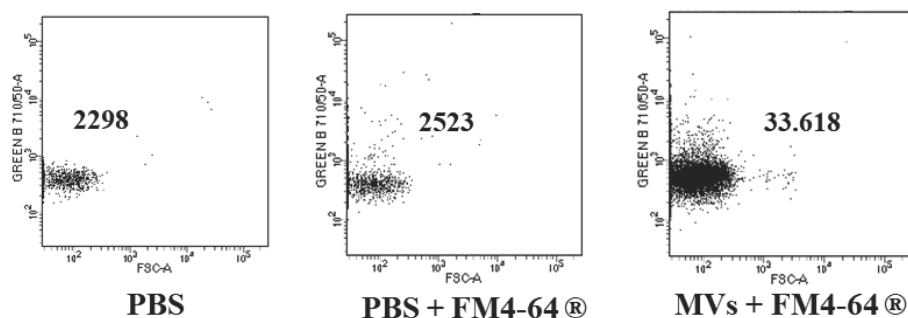
Normalmente, la tasa de vesiculación es determinada por el cálculo de la proteína o LPS asociado a las MVs. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito que mediante Citometría de Alta resolución (*High-sensitive Flow Cytometry*) las MVs pueden ser directamente cuantificadas a partir de sobrenadantes de cultivo (Wieser et al., 2014).

##### 5.5.1.1 Optimización de los parámetros para la cuantificación de MVs mediante citometría de alta resolución.

La citometría de flujo de alta resolución emplea un marcaje fluorescente de las MVs y éstas serán detectadas mediante la señal emitida, independientemente de su tamaño (Nolte-<sup>t</sup> Hoen et al., 2012). El marcador fluorescente que se empleó para el ensayo fue el agente FM4-64 que es un marcador que se intercala con una elevada afinidad a las membranas lipídicas, produciendo un incremento de la emisión de la fluorescencia.

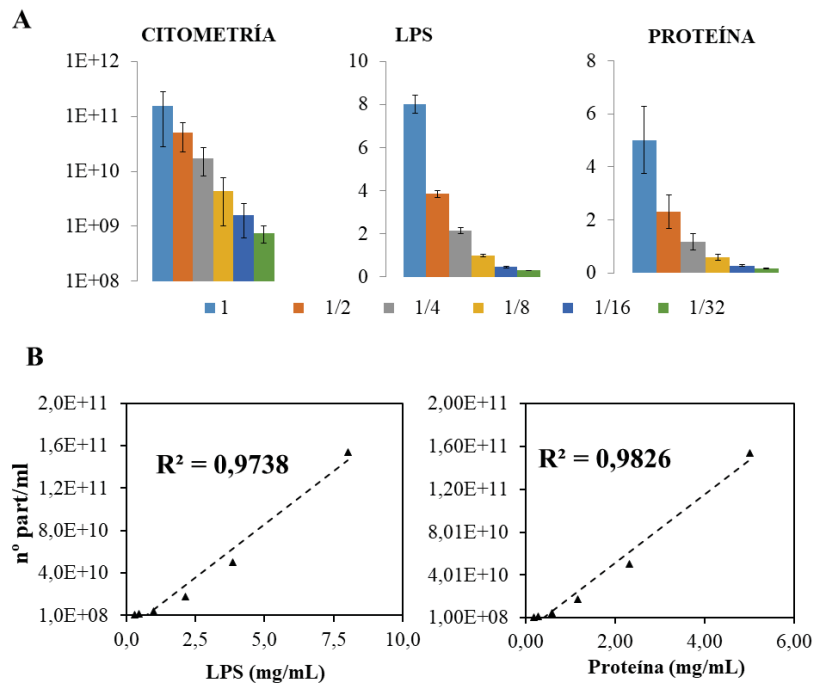
En primer lugar, se decidió optimizar los parámetros para la cuantificación de MVs, evaluando si el número de vesículas detectado por citometría era proporcional a los valores de proteína y de LPS de una suspensión de MVs. Para ello, la bacteria fue incubada hasta una  $DO_{600}$  de 1,6, que corresponde casi a la fase exponencial tardía de crecimiento y las MVs fueron aisladas a partir de 1,5 L de sobrenadante.

Las MVs fueron diluidas en serie (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) y para cada dilución se determinaron los valores de proteína (Bradford) y LPS (Purpald). Para el recuento de MVs mediante citometría, las muestras fueron diluidas 1:10.000 en PBS, con el fin de ajustar la concentración de MVs a una frecuencia de <10.000 eventos/s. Las suspensiones de MVs fueron teñidas con FM4-64 a una concentración final de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 5 minutos e inmediatamente fueron procesadas en el citómetro. Se determinó el número de eventos totales durante 30 segundos, aunque previamente fue necesario estabilizar el flujo de la muestra durante 1 minuto y ajustar la velocidad de flujo del instrumento a la menor velocidad posible (Fig 4.27). Como las MVs por tamaño se localizan en el área del “ruido” del instrumento, fue necesario también ajustar el umbral (*threshold*) para las soluciones de PBS y también se ajustó la potencia del láser para evitar autofluorescencia de las MVs analizando una muestra de MVs sin marcar con FM4-64 (no mostrado).



**Figura 4.27. Perfiles de muestras obtenidos mediante análisis con el citómetro BD FACSAria™ III Cell Sorter.** (A) Gráfica de puntos donde se representa la intensidad de la fluorescencia emitida (*y-axis*) respecto el área del *Forward-scattered light* (*x-axis*) (FSC) de las muestras de PBS sin agente de tinción, PBS con FM4-64 y muestra de MVs teñida con FM4-64 a una concentración final de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  durante 5 minutos. El “*threshold*” del instrumento fue establecido en el parámetro de fluorescencia para discriminar las partículas no fluorescentes de las MVs marcadas con el fluoróforo, aunque permitiendo detectar una media de 20-30 eventos/s en los diferentes blancos. También se indica el número de eventos totales contados durante 30 segundos, observando un claro aumento en el número de eventos detectados en muestras de MVs teñidas. En la figura no se muestra MVs sin teñir, aunque los valores fueron similares a los del PBS descartando fenómenos de autofluorescencia.

Para realizar una determinación cuantitativa absoluta de las MVs se necesita disponer de patrones de esferas fluorescentes con una concentración de partículas conocida. Se recomienda emplear un patrón lo más similar posible a las muestras de MVs (Van der Vlist et al., 2012). Concretamente se utilizaron esferas fluorescentes de color rojo y con un tamaño de 100 nm. Éstas fueron analizadas en las mismas condiciones que las suspensiones de MVs y se determinó el número de eventos en tres determinaciones independientes, obteniendo un valor de  $23404 \pm 804$  eventos totales que corresponden a una concentración de Fluorospheres de  $3,64 \times 10^8 \mu\text{Sph/mL}$ . A continuación, se calculó la concentración de MVs para cada muestra y se representó en función de la cantidad de proteína o LPS, observando que la disminución en la cantidad de MVs en citometría conllevaba una disminución proporcional en la cantidad de proteína o LPS cuantificado (Fig. 4.28).



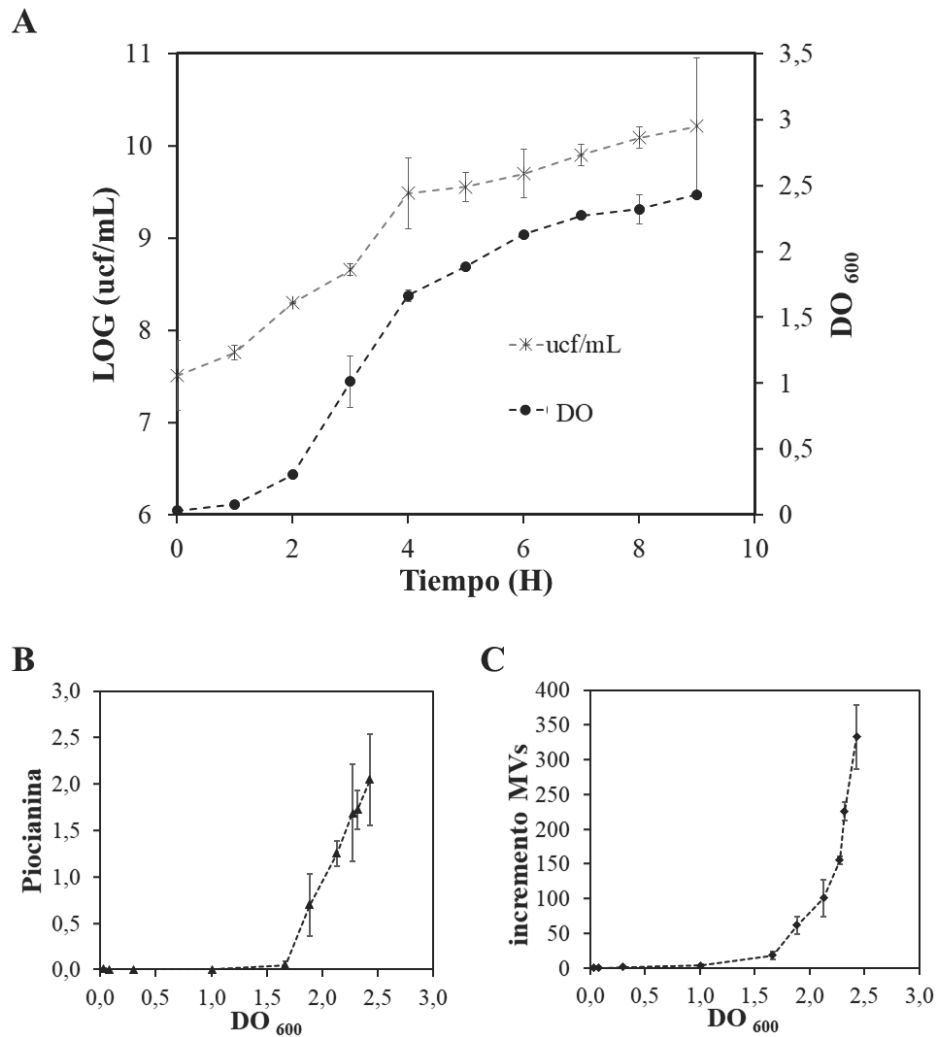
**Fig 4.28. Cuantificación de MVs mediante Citometría, LPS y Proteína de diluciones seriadas de MVs.** (A) Medida de los valores medios y sus desviaciones estándar para cada dilución. (B) Gráficas donde se muestra la proporcionalidad entre la concentración de MVs determinada por citometría respecto proteína o LPS, con un coeficiente de correlación  $\sim 1$ .

#### 4.5.1.2 Caracterización de la vesiculación directamente de los sobrenadantes de cultivo de *P. aeruginosa* PAO1.

Una vez demostrado que la concentración de MVs se puede determinar directamente a partir de sobrenadantes de suspensiones bacterianas, se decidió realizar el seguimiento de la vesiculación a lo largo de la curva de crecimiento bacteriano. Para ello, se cultivó la bacteria en 500 mL de TSB irradiado con un inóculo del 1% de un cultivo crecido durante la noche (o/n). A cada hora se cogieron dos alícuotas del cultivo de 7 mL para determinar el crecimiento bacteriano (determinación número de células viables y  $DO_{600}$ ) y el número de MVs por citometría. Además, se calculó la concentración de piocianina, ya que su secreción determina el inicio de la transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria. Ésta se cuantificó siguiendo el protocolo descrito en por Sonnleitner et al. (2011).

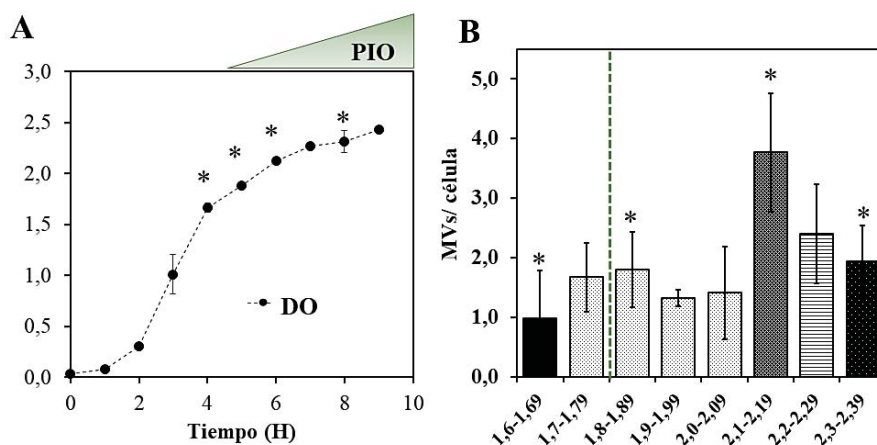
Las muestras de citometría se prepararon tal como se describe en Material y Métodos (apartado 3.4). Resumidamente, 1 mL de cada réplica fue centrifugado para eliminar las células presentes y a continuación, se filtraron por 0,22  $\mu\text{m}$  y se guardaron los sobrenadantes filtrados a 4°C un máximo de 24 horas. Las muestras, justo antes de ser analizadas en el citómetro, se tiñeron con FM4-64 a una concentración final de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  durante 5 minutos. Se volvió a establecer un nuevo umbral de fluorescencia para el TSB y se determinó la concentración de MVs tal como se describe en el apartado anterior. El número de MVs fue normalizado respecto al número de células viables presentes en el cultivo en el momento de la toma de muestra.

Se caracterizó el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 en las condiciones anteriores, determinando que la transición hacia la fase estacionaria se iniciaba a las 4 horas, con un cambio de pendiente a una DO  $\sim$  1,6 y a un recuento de viables de  $1 \times 10^9$  ucf/mL (Fig 4.29, A). Asimismo, éste fue el último punto de la curva en el que no se detectaba la producción de piocianina, indicando que este punto pertenecía a la fase exponencial. Sólo a partir de una DO de 1,8 se empezó a detectar piocianina en el medio, indicando el ajuste de la fisiología de la bacteria a la fase estacionaria (Fig 4.29, B). Paralelamente, a partir de este punto y también en este punto, se observó un incremento exponencial de la concentración de MVs en los sobrenadantes del cultivo determinado por citometría (Fig 4.29, C).



**Figura 4.29. Caracterización de la vesiculación en función de la fase de crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1.** (A) Curva de crecimiento donde se muestran el número de células/mL y la DO respecto al tiempo. (B) Concentración relativa de picrocianina en función de la DO. (C) Concentración de MVs normalizada respecto a la DO del cultivo. Se puede observar que el incremento en la vesiculación es paralelo a la concentración de picrocianina del cultivo. Los datos mostrados son representativos de 4 experimentos independientes, con dos réplicas biológicas. Se muestran los valores medios  $\pm$  desviación estándar ( $n=4,2$ ).

Para determinar si este incremento en la vesiculación estaba causado por una acumulación de MVs a medida que aumentaba la población bacteriana, se normalizó la concentración de MVs respecto al número de células para cada punto de la curva (Fig 4.30). De este modo, se pudo observar que la relación MVs - célula no se mantenía constante a lo largo de la curva de crecimiento de la bacteria, indicando que la tasa de vesiculación variaba en función de la fase de crecimiento. En las primeras horas de incubación en que la bacteria se encuentra creciendo exponencialmente, la ratio MVs/célula se mantuvo constante con un valor cercano a 1 MVs por célula. A partir de las 5 horas de cultivo y una DO cercana a 1,7 el número de MVs/célula empezó a aumentar, hasta llegar al máximo de vesiculación en el punto de DO  $\sim 2,1$ , situándose alrededor de 4 MVs/célula. Posteriormente, el número de MVs empezó a disminuir, sugiriendo que las MVs presentes en los cultivos estaban desapareciendo, ya sea por reabsorción o degradación de las MVs en el medio.



**Figura 4.30. Análisis de la relación de MVs respecto el número de células.** (A) Curva de DO respecto el tiempo de incubación. Asimismo, se indica el inicio de la producción de pirocianina (PIO) y la tendencia de acumulación en el medio. (B) Gráfica de barras donde se muestra la tasa de vesiculación (MVs/célula) y su SD dentro de un rango de DO. El análisis de grupos homogéneos determinó la existencia de 5 grupos con tasas de vesiculación estadísticamente diferentes, indicado mediante el uso de distintas tramas (test de ANOVA, procedimiento LSD,  $p$ -value  $<0,01$ ). Los datos mostrados son representativos de 4 experimentos independientes, con dos réplicas técnicas. Los asteriscos resaltan aquellos puntos que se escogieron para confirmar los resultados de citometría como se verá en apartado 5.5.1.3. La línea verde indica el inicio de la secreción de pirocianina.

El análisis de múltiples rangos empleando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, nos permitió discriminar entre 5 etapas en las que la tasa de vesiculación era estadísticamente diferente (Test de ANOVA, por aproximación del

ensayo de LSD,  $p$ -valor  $< 0,01$ ) (Fig 4.30). Empleando esta aproximación estadística hay un riesgo del 5,0 % de que las diferencias detectadas no sean reales, por lo que es preciso su validación. Por ello, se escogieron 4 puntos de la curva para confirmar la fluctuación del número de MVs en los sobrenadantes (Fig. 30, asteriscos).

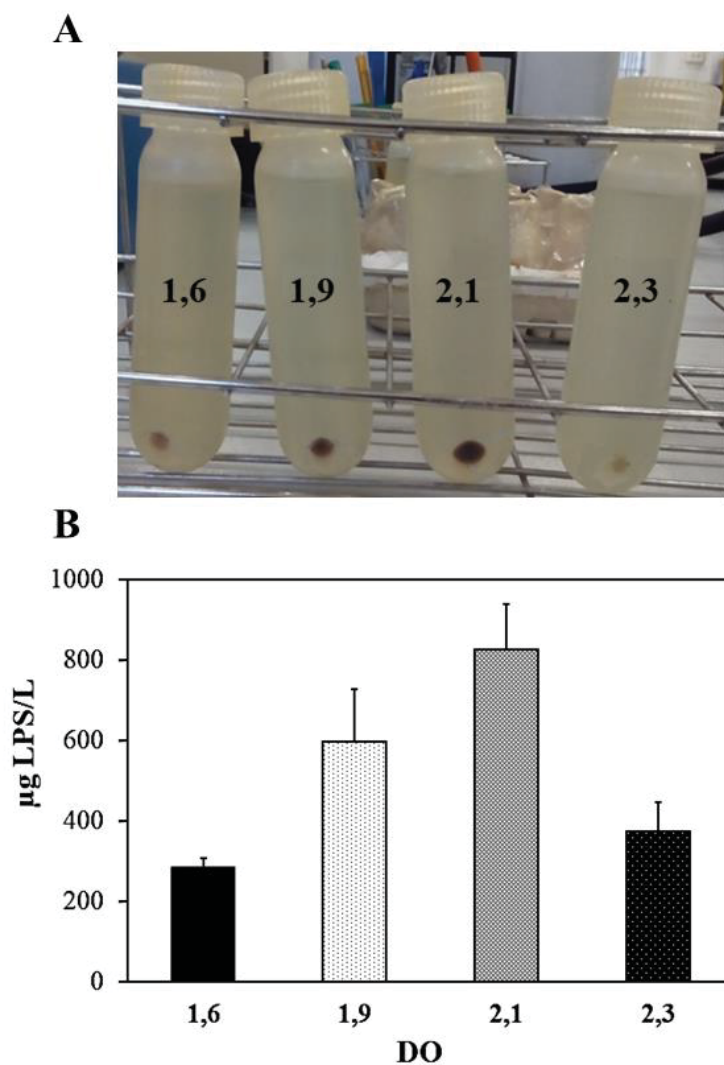
#### *4.5.1.3 Confirmación de los resultados obtenidos mediante citometría.*

Se aislaron MVs de cultivos inoculados con el mismo preinóculo y crecidos hasta 4 densidades ópticas en las que las tasas de vesiculación habían sido distintas y que además correspondían a puntos diferentes de la curva de crecimiento: exponencial tardía (**1,6**), inicio de la transición entre la fase exponencial y estacionaria (**1,9**), inicio de la fase estacionaria (**2,1**) y fase estacionaria (**2,3**) (ver Fig. 4.30, asteriscos). A continuación, se calcularon los distintos rendimientos de producción de vesículas en cada tiempo, mediante el cálculo del LPS. Los resultados se muestran en la Figura 4.31.

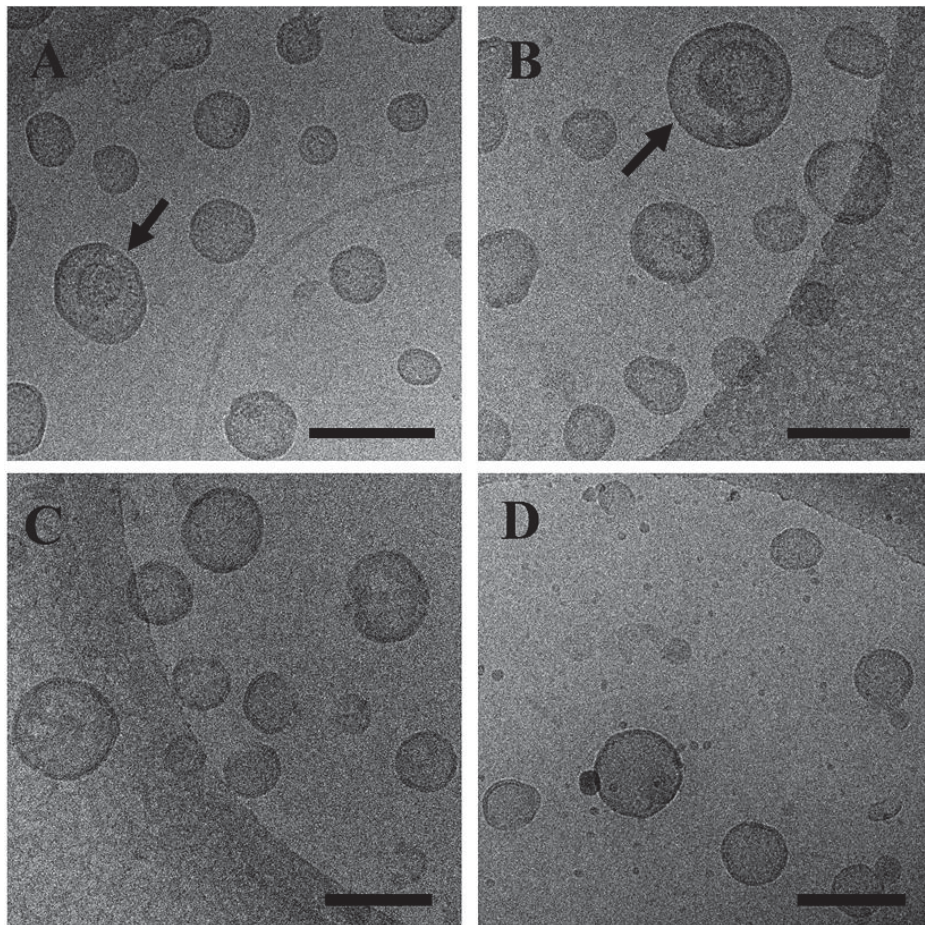
Se observó un incremento en la cantidad de MVs determinada mediante el cálculo del LPS, entre las DO comprendidas entre 1,6 y 2,1. Mientras que en plena fase estacionaria y después de 8 horas de cultivo, el rendimiento en la obtención de MVs fue considerablemente menor. Mediante el análisis de la variancia se determinó que existían diferencias significativas entre los distintos rendimientos obtenidos en cada tiempo (ANOVA test  $p$ -value  $< 0,001$ ) y mediante la prueba de múltiples rangos realizada con el procedimiento de Tukey HSD se comprobó que los distintos rendimientos a cada punto, eran distintos entre ellos, que se indican mediante el uso de un entramado distinto. Además, se confirmó que los pellets obtenido estaban compuestos por MVs mediante su visualización por Cryo-EM (Fig. 4.32).

Por lo tanto, se pudo determinar que la producción de MVs no se mantenía constante a lo largo del tiempo y que ésta aumentaba durante la fase de transición entre la fase exponencial y la estacionaria.





**Figura 4.31. Cuantificación de los rendimientos de MVs obtenidos a partir de cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 recogidos a distintos tiempos.** (A) Pellets de MVs obtenidos en los tubos a cada DO. (B) Cuantificación del rendimiento de MVs por litro de cultivo mediante el cálculo del LPS por el método de Purpald, se representan las medias  $\pm$  DO de 5 experimentos independientes, cuantificados por duplicado (n=5,2).

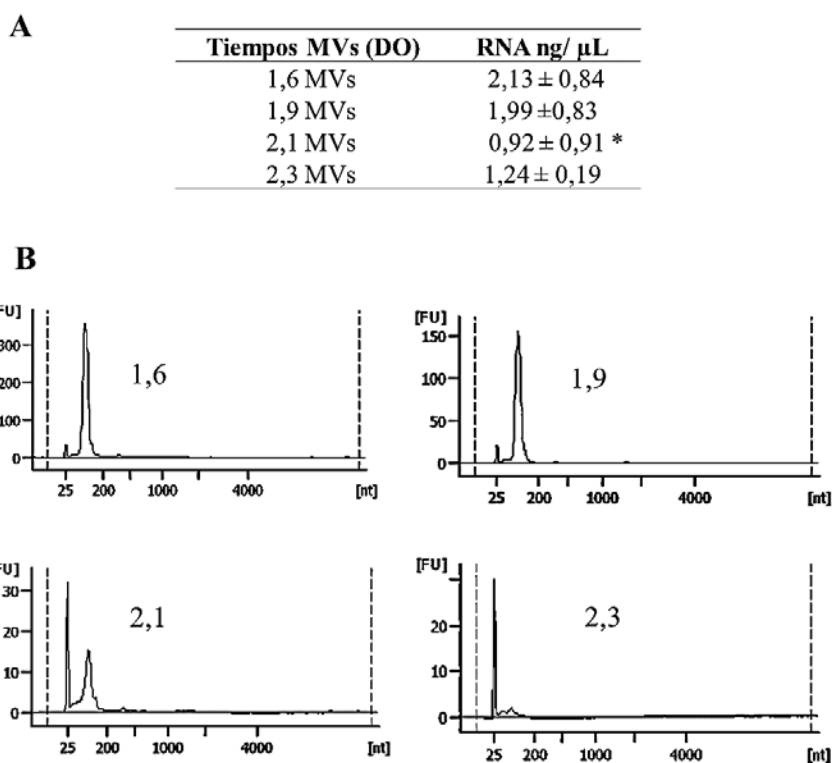


**Figura 4.32. Cryo-EM de MVs obtenidas a distintos tiempos y preparadas mediante Plunge-Freezing.** (A) MVs 1,6 (B) 1,9 (C) 2,1 (D) 2,3. Para todas las muestras se observaron cerca de 100 campos, visualizando principalmente la presencia de OMVs. Aunque en los tiempos de 1,6 y 1,9 se pudo observar la presencia de O-IMVs (flecha negra). En general las MVs estaban íntegras y no se observaron fragmentos de membrana procedentes de la lisis. Barras de 200 nm.

#### **4.5.2. Análisis mediante RT-qPCR del contenido de sRNAs en MVs obtenidas a distintos tiempos de la curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.**

Para continuar explorando la posibilidad de que las bacterias secreten sRNAs mediante MVs, nos propusimos evaluar la expresión de PhrS, CrcZ y RsmZ en MVs aisladas a distintos tiempos y comparar su expresión con la de las células. En primer lugar, se obtuvieron MVs aisladas de cultivos a las 4 densidades ópticas anteriores y se trataron externamente con el enzima RNasa para eliminar aquel RNA que no estuviera

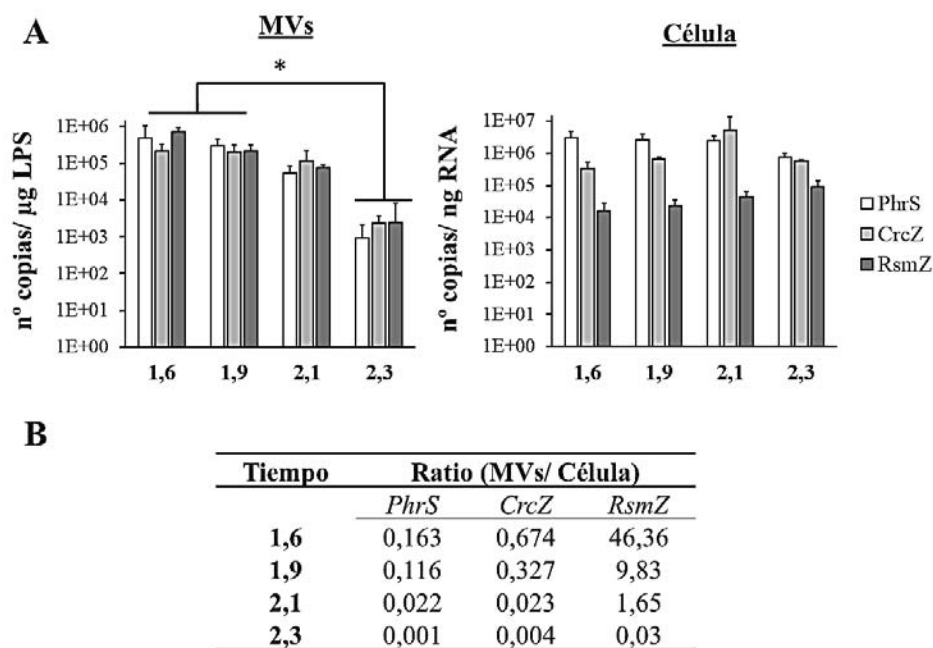
interiorizado en MVs. Seguidamente, el exceso de enzima fue eliminado mediante la dilución de las MVs hasta 100 veces el volumen inicial del pellet. Las MVs se centrifugaron y se resuspendieron en agua utilizando el menor volumen posible. A continuación, se calculó el contenido de LPS de cada punto y se extrajo el RNA procedente de 70  $\mu\text{g}$  de LPS. Una vez aislado el RNA, se calculó su concentración en cada tiempo y se analizaron los perfiles electroforéticos (Fig 4.33).



**Figura 4.33. RNA total en MVs obtenidas a distintos tiempos (DO) de incubación de *P. aeruginosa* PAO1.** (A) Tabla donde se muestran la media  $\pm$  SD de la concentración de RNA calculada mediante Quibit-HS ( $n=5,2$ ). El asterisco resalta que en el punto 2,1, la SD es igual a la media. Esto es debido a que en 3 experimentos la concentración de RNA estaba fuera de los límites de detección de Quibit-HS. (B) Perfiles electroforéticos representativos de los 4 puntos, obtenidos mediante en el Bioanalyzer mediante el uso del pico RNA 6000 Chip. El primer pico que se observa a 25 nt, corresponde el patrón interno de fluorescencia.

A continuación, se quiso comparar la expresión de sRNAs en MVs respecto a la expresión en las células. Para ello, se emplearon las muestras anteriores para evaluar la expresión de los tres sRNAs en muestras de MVs mediante RT-qPCR. Los resultados fueron normalizados respecto a la cantidad de MVs (Fig 4.34). Para la determinación de la

expresión de sRNAs en la bacteria, el RNA fue extraído de alícuotas de 500  $\mu$ L del cultivo tomadas a los tiempos establecidos. A continuación, las células fueron separadas por centrifugación y se obtuvo el RNA. A continuación, 5 ng de RNA celular fueron tratados con DNasa y sometidos a RT-qPCR. El contenido de RNA mediante RT-PCR se determinó a partir de 5 experimentos independientes, con 2 réplicas técnicas cada uno (Fig 4.34).



**Figura 4.34. Expresión diferencial de sRNAs de *P. aeruginosa* PAO1 en MVs obtenidas a distintos tiempos.** Se observaron diferencias en el nivel de expresión temporal de los tres sRNAs en MVs, detectando unos niveles mayores de expresión en el punto 1,6 que corresponde al punto final de la exponencial. (A) Determinación de los niveles de expresión de sRNAs en MVs y en la célula expresados en número de copias/ $\mu$ g LPS y número de copias/ng RNA respectivamente. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de sRNAs de MVs obtenidas en el punto 2,3, respecto a los puntos de 1,6 y 1,9 (test de Kluskal-Wallis, p-value < 0,01), mientras que no se observaron diferencias estadísticas entre los valores de sRNAs en la célula. (B) Relación de los niveles de expresión de sRNAs en MVs respecto el número de copias en la bacteria. Se observa un descenso en la relación de sRNAs MVs/célula a lo largo de los 4 puntos.

La comparación de la expresión de los sRNAs interiorizados en MVs, mostró diferencias en la concentración de estos a lo largo del crecimiento bacteriano (Fig 4.34).

Concretamente, se observó que la concentración individual de cada sRNA era mayor en los puntos de 1,6 y 1,9, empezando a disminuir a 2,1 y siendo muy inferior a 2,3. Concretamente, al comparar la expresión entre 1,6 y 2,3, se observó que es 1000 veces superior en 1,6. Esta disminución de RNA en MVs durante el crecimiento bacteriano, concuerda con los resultados obtenidos en el apartado anterior, donde se detectaba una menor concentración de RNA tanto por cuantificación fluorimétrica como por Bioanalyzer (ver Fig 4.33).

Además, se detectó que los niveles de sRNAs en MVs no eran correlativos con los niveles detectados en el citoplasma de la célula. Mientras en vesículas se detectaba una distinta encapsulación de sRNAs durante el tiempo, en células no se detectaron diferencias estadísticas entre los diferentes puntos (Fig 4.34, A, célula). Además, se observó una relación inversamente proporcional entre los sRNAs de células y MVs (Fig 4.34, B). Es decir, a medida que pasaba el tiempo la proporción sRNA MVs/célula era menor.

#### 4.5.3 RNA-seq de MVs de *P. aeruginosa* PAO1 obtenidas a distintos tiempos mediante RT-qPCR.

Para caracterizar el contenido de RNA en MVs obtenidas a distintos tiempos, realizamos una RNA-seq de las distintas muestras tal como hemos detallado anteriormente. Se prepararon dos librerías de sRNA para cada tiempo a partir de muestras biológicas independientes y los resultados del número total de secuencias obtenidas se muestran en la Tabla 4.9.

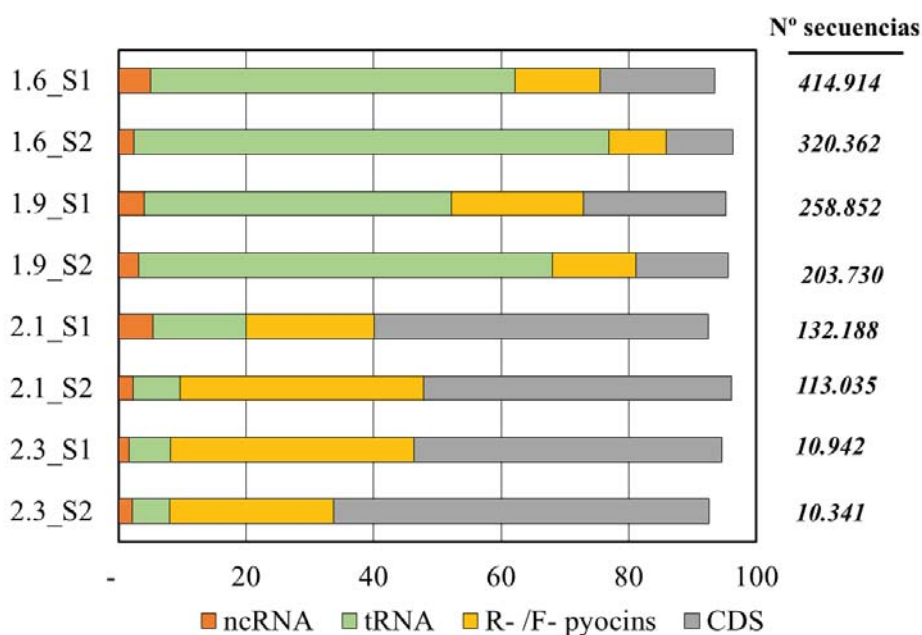
**Tabla 4.9. Número de secuencias identificadas para cada tiempo, y clasificadas en función de qué regiones alinean del genoma de *P. aeruginosa* PAO1.**

	Nº secuencias promedio ± SD	PAO1 genoma (%)	Regiones codificantes (%)	Regiones no codificantes (%)	Desconocido (%)
<b>1,6</b>	2.047.950±122267	87	18	90,3	38
<b>1,9</b>	1.312.271 ±306058	96	18	90	36
<b>2,1</b>	913.353± 58370	86	13	82	21
<b>2,3</b>	303.052 ± 57709	32	3,6	87	4,7

El número mayor de secuencias fueron detectadas en el punto de DO de 1,6, mientras que la menor cantidad de secuencias fue en el punto 2,3. De las secuencias identificadas, alrededor del 90% se alineaban con el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1,

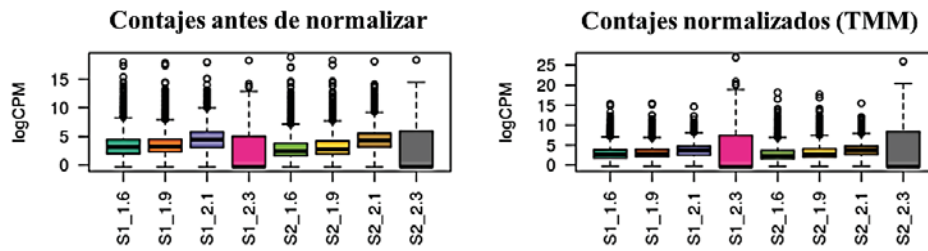
excepto para el punto 2,3 que fue del 30%. Las secuencias alineadas, se clasificaron en función de si estaban situadas en zonas codificantes, regiones no codificantes o bien, desconocidas. Principalmente, las secuencias se alinearon en zonas no codificantes de proteínas (~90%), aunque estas zonas correspondían a rRNAs y tRNA. Por otra parte, un número significativo de secuencias se alinearon en zonas que no estaban caracterizadas y por lo tanto, se desconoce si éstas pertenecen a regiones codificantes o no. Es importante destacar, que el sumatorio de los porcentajes es mayor del 100%, ya que una misma secuencia puede alinear en más de una zona.

Se identificaron alrededor de 5.000 genes, de los cuales 1.000 se identificaron con al menos 15 secuencias. En contraposición, sólo se detectaron 100 genes en el punto 2,3 cumpliendo dicho criterio. Los transcritos identificados se clasificaron por los biotipos y en función de su abundancia (Fig. 4.35). Para este análisis se eliminaron las secuencias correspondientes al rRNA ribosómico (Fig. 4.35). Se observó que el biotipo mayoritario de las muestras obtenidas en los puntos 1,6 y 1,9 eran los tRNAs, con un  $66\% \pm 12$  y un  $57\% \pm 12$  respectivamente. Sin embargo, las muestras obtenidas en los puntos de la fase estacionaria (2,1 y 2,3) presentaban unos porcentajes de tRNA del  $11\% \pm 5$  y  $6 \pm 0,5$  respectivamente. Por otra parte, en los puntos 2,1 y 2,3 se observó un incremento en la presencia de secuencias que codificarían para proteínas (CDS) representando un porcentaje mayor respecto a los tRNAs. También se identificaron en todas las muestras secuencias que coinciden con las F o R piocinas de *Pseudomonas aeruginosa*. Así mismo, en todas las muestras el porcentaje de ncRNAs detectado fue minoritario.



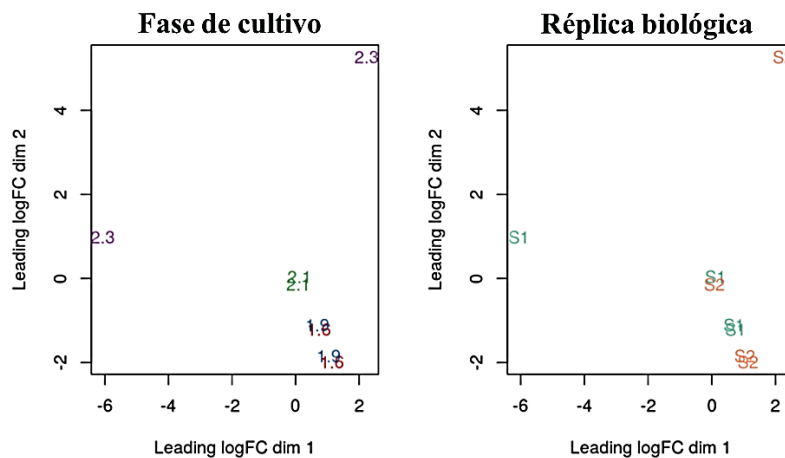
**Figura 4.35. Distribución de los distintos biotipos de sRNAs identificados en MVs de *P. aeruginosa* PAO1 a distintos tiempos de crecimiento.** A la derecha se indica el número de secuencias totales detectadas por muestra, eliminando aquellas secuencias que se alineaban con rRNA. Se observó una disminución en el número de secuencias identificadas en función del tiempo. El gráfico muestra la distribución en porcentaje de cada biotipo de RNA.

Así pues, para determinar si la diferente cantidad de RNA empaquetada en MVs obtenidas a distintos tiempos, también conllevaba un distinto patrón de RNAs, se procedió a la comparación estadística de las muestras. En primer lugar, se procedió a la transformación y normalización de los datos obtenidos por muestra empleando el paquete edgeR de Bioconductor, donde los datos de expresión fueron transformados a log-CPM:  $\log_2(\text{CPM: contajes por millón})$ . A continuación y para poder comparar, cada muestra se multiplicó por un valor corrector calculado con el mismo paquete informático, y las muestras se normalizaron a partir del método TMM (*trimmed mean of M-values method*, TMM). El análisis estadístico se realizó en colaboración con la unidad de Bioestadística del Hospital la Vall d'Hebron.



**Figura 4.36.** Normalización de las secuencias detectadas de RNAs empaquetados en MVs de *P. aeruginosa* PAO1 antes y después de la normalización por el método TMM. Gráfica de cajas y bigotes mostrando la distribución de los contajes por cada punto y réplica

El análisis mostró que las dos muestras obtenidas en los puntos 2,3 de DO presentaban una distribución muy diferente respecto a las otras muestras (Fig. 4.36). De modo que, las muestras obtenidas a DO 1,6, 1,9 y 2,1 presentaron distribuciones similares y por lo tanto se consiguió la normalización. Asimismo, se valoró la distribución de los datos normalizados mediante su representación gráfica con la técnica de *Multi Dimensional Scaling*, que permite visualizar las muestras en función de lo similares que son entre ellas.



**Figura 4.37.** Distribución de las secuencias identificadas en MVs de *P. aeruginosa* obtenida a distintos tiempos de crecimiento y normalizadas por el método TMM. Las distintas muestras fueron agrupadas en función de la fase de cultivo y la réplica biológica.

Los datos fueron representados en función de la réplica y del tiempo de obtención (Fig. 4.37), observando que los datos normalizados de las muestras obtenidas 1,6 - 1,9 - 2,1 se encontraban agrupados tanto por fase de cultivo, como por réplica biológica. Por lo tanto,



estos tres puntos presentaban una distribución y variabilidad parecida. Sin embargo, el punto 2,3 y sus réplicas mostraban una distribución completamente distinta, confirmando que 2,3 era completamente diferente a los otros puntos. Todo ello, hizo imposible la comparación de 2,3 con el resto de puntos y por lo tanto este punto fue excluido del análisis ya que su inclusión conduciría a conclusiones erróneas.

A continuación, se compararon las muestras entre los RNAs obtenidos a distintos tiempos, calculando la media de contajes por gen y se evaluó si existían diferencias en la expresión media de cada gen, mediante la determinación del  $\text{Log}_2\text{-FC}$  entre los distintos grupos. Además, mediante el cálculo del  $p$ -value ajustado se valoraron si estas diferencias eran estadísticamente significativas para cada gen. Se realizaron las siguientes comparaciones (C):

**C1: 1,6 vs 1,9**

**C2: 1,6 vs 2,1**

**C3: 1,9 vs 2,1**

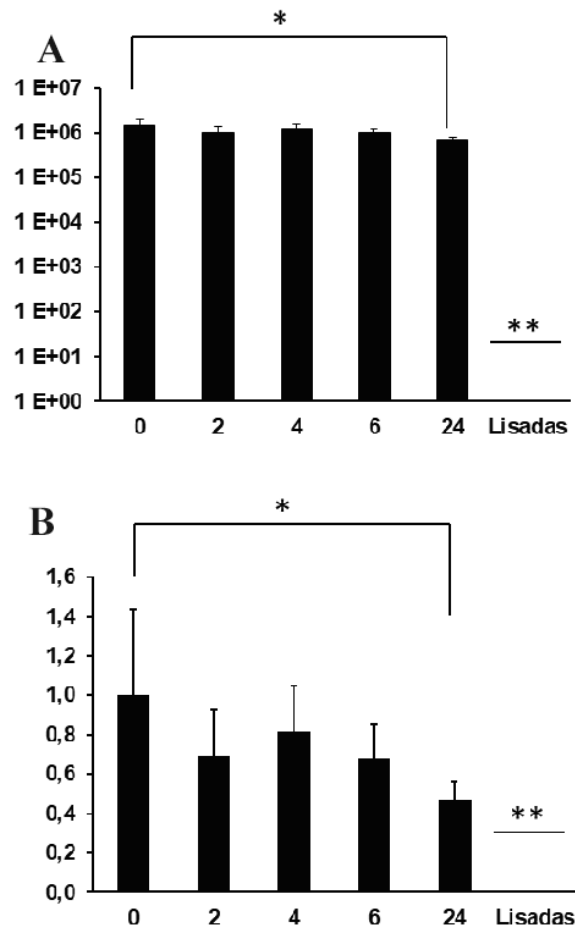
Obtuvimos 600 genes que presentaban una expresión diferencial y que a su vez, al menos se habían identificado con 15 secuencias. En general, no se detectó ningún gen con un cambio  $\log_2\text{-FC} \geq 1$ , lo que significa que no había ningún gen que presentara un cambio en la expresión de más del doble. No obstante, si se detectaron algunos genes que presentaron un cambio de al menos el 50%, detectando 20 genes para la comparación C2 y 16 genes para la comparación C3. Las muestras 1,6 y 1,9 fueron las más parecidas entre ellas, detectando una diferencia máxima  $\pm 0,2$  del  $\log_2\text{-FC}$ , que representa una diferencia en la expresión del 20%. En la Tabla A2 de Anexos se recoge una lista de 150 genes con al menos una diferencia de expresión del 30% entre las comparaciones C2 y C3.

Sin embargo, las pequeñas diferencias detectadas no fueron estadísticamente significativas debido a que el  $p$ -valor ajustado fue de 1 para todos los genes identificados, lo cual significa que hay una probabilidad de un 100% de que la diferencia detectada no sea real.

#### 4.6. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS sRNAs EN MVs de *P. aeruginosa* PAO1 DURANTE UNA INCUBACIÓN A 37°C

Durante el estudio realizado, se ha observado una disminución del contenido de RNA en MVs, tanto mediante RNA-seq como RT-qPCR entre el punto 2,1 y 2,3. Para descartar que esta disminución fuera asociada a la degradación del RNA interiorizado en las MVs, se decidió realizar un ensayo de estabilidad monitorizando la concentración del sRNA CrcZ en MVs aisladas respecto al tiempo. Para ello, una muestra de MVs aisladas y tratadas externamente con RNAsa, se resuspendió en TSB doble concentrado (v/v) y se incubaron a 37°C durante 2, 4, 6 y 24 horas. A cada tiempo, el RNA fue extraído y se realizó una RT-qPCR. Los datos obtenidos para cada tiempo se muestran en la Figura 4.38.

Durante las 6 primeras horas de incubación la concentración de sRNAs se mantuvo estable, aunque a las 24 horas se observó un descenso del 47% en la señal del sRNA interiorizado en MVs. Como control se utilizó una muestra de MVs resuspendida en TSB y sometida a un tratamiento de lisis con tritón X-100 y se midió la concentración de sRNA después de una incubación de 6 horas, sin que se detectara presencia de CrcZ mediante RT-qPCR.



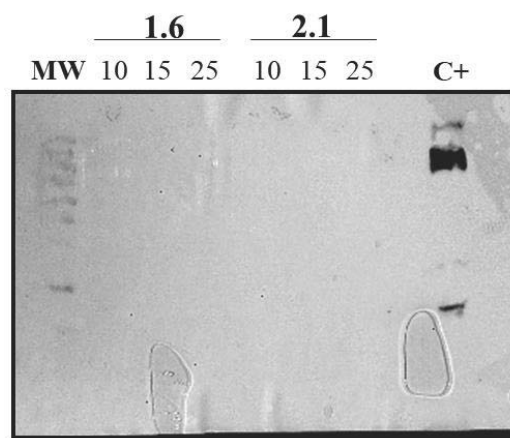
**Figura 4.38. Cuantificación de CrcZ en MVs de *P. aeruginosa* PAO1 a distintos tiempos de incubación.** (A) Número de copias por µg de LPS respecto el tiempo de incubación (horas). (B) Se representan los mismos datos que en A, pero la expresión fue normalizada respecto a la media de todas las copias, detectándose una clara disminución del 47% de la cantidad de sRNAs entre los tiempos de 0 y 24 horas (HSD de Tukey \*p-value < 0,027, \*\*p-value < 0.001).

#### 4.7. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A RNA Hfq EN MUESTRAS DE MVs de *P. aeruginosa* PAO1

Hfq es una proteína de unión al RNA que promueve la interacción antisentido entre sRNAs y mRNAs, ejerciendo un papel regulador central en la fisiología de la bacteria. Además, se ha observado que se une con elevada afinidad a tRNAs (Lee & Feig, 2008). Al observar que el RNA encapsulado dentro de las MVs presentaban una elevada

estabilidad, decidimos evaluar la posibilidad que la proteína Hfq se encontrara en el interior de la MVs y por lo tanto, pudiera estar protegiendo el RNA de la degradación.

Para ello, se realizó un western blot en el que se cargaron distintas cantidades de MVs de de *P. aeruginosa* PAO1 (10, 15, 25  $\mu$ g de LPS) obtenidas a dos densidades ópticas (1,6 y 2,1). En el ensayo no se detectó la presencia de Hfq en ninguna de las muestras ensayadas, sugiriendo que Hfq no estaría internalizada en MVs, aunque tampoco se podría descartar (Fig 4.39). Se añadió como control positivo la proteína purificada de Hfq, observando un intenso marcaje (C+).



**Figura 4.39. Western blot representativo analizando la presencia de Hfq en muestras de MVs de *P. aeruginosa* PAO1 obtenidas a diferentes DO.** Se evaluaron diferentes cantidades de MVs ( $\mu$ g LPS). Para el marcaje se empleó un anticuerpo primario anti-Hfq y un secundario anti-*rabbit* acoplado a fosfatasa alcalina. El control positivo (C+) presenta marcaje de bandas de diferentes pesos moleculares, que consisten en los distintos complejos proteicos que forma Hfq.

#### 4.8. TRANSFERENCIA DE RNAs MEDIADA POR MVs

Con el fin de evaluar la capacidad de las MVs para vehiculizar sRNAs, se decidió realizar un ensayo de transferencia mediada por vesículas. Para ello, empleamos diferentes mutantes delecionados para algún sRNAs en *P. aeruginosa* PAO1 y cuyo mecanismo de acción estuviera descrito. Encontramos que CrcZ y RsmZ cumplían dichos criterios y que además se encontraban sobreexpresados en *P. aeruginosa* durante la fase de biofilm.

Para poder monitorizar la adquisición de las MVs por parte de la cepa mutante es necesario el uso de genes reporteros. Para CrcZ y RsmZ, los constructos reporteros ya diseñados emplean el sistema *lacZ*, que contiene el gen que codifica para el enzima  $\beta$ -

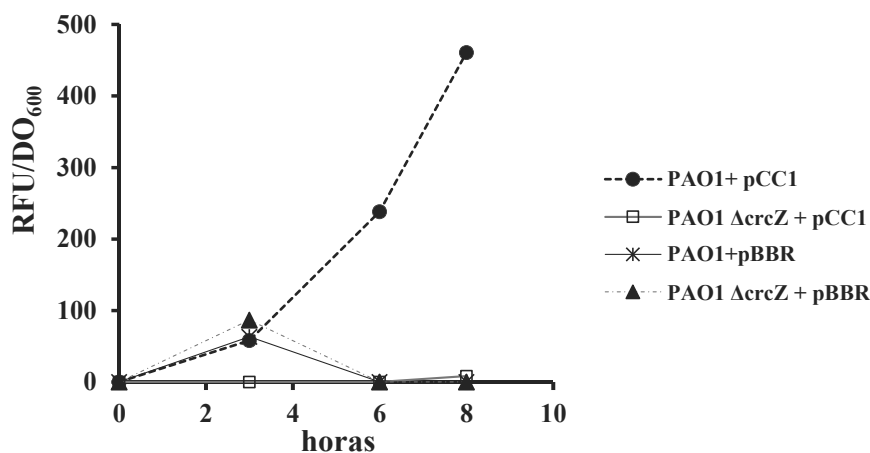
galactosidasa y que cataliza la hidrólisis del o-nitrofenol- $\beta$ -D-galactosido (OPNG) produciendo un cambio de color. Es necesario someter las bacterias a un tratamiento de lisis para liberar el enzima y cuantificar la actividad del gen reportero mediante la reacción colorimétrica y por tanto es imposible realizar una estimación directa de la actividad del gen reportero. Así pues, se decidió substituir del constructo reportero el gen codificante para lacZ por la proteína fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) y así poder monitorizar la transferencia de sRNAs mediada MVs con más facilidad.

#### 4.8.1 Evaluación de la transferencia de CrcZ por MVs.

En primer lugar se decidió trabajar con la cepa mutante para *crcZ* (PAO6679) (Sonnleitner et al., 2009). CrcZ está involucrado en la regulación del control del metabolismo del carbono. En un escenario con una fuente de carbono no preferente, se induce la síntesis de CrcZ que secuestra la proteína Hfq y produce una liberación de los RBS de aquellos mRNAs que metabolizan fuentes no preferentes de carbono. Como gen reportero se emplea el gen *amiE* que codifica para una amidasa (Sonnleitner & Bläsi, 2014). Por lo tanto, se generó el constructo reportero traduccional *amiE::sf-GFP* para detectar la posible captación de CrcZ contenido en MVs por la cepa delecionada para el gen *crcZ*.

##### 4.8.1.1 Generación y validación del constructo *amiE::sf-GFP*.

En primer lugar, se generó el constructo *amiE::sf-GFP* (pCC1) tal como se describe en Material y Métodos (apartado 20.3.1). Para comprobar la eficiencia del sistema reportero, se monitorizó el crecimiento de las cepas PAO1 y PAO1 $\Delta$ *crcZ* transformadas con el plásmido pCC1 (Fig 4.40), observando un incremento de la fluorescencia en la cepa PAO1+ pCC1.



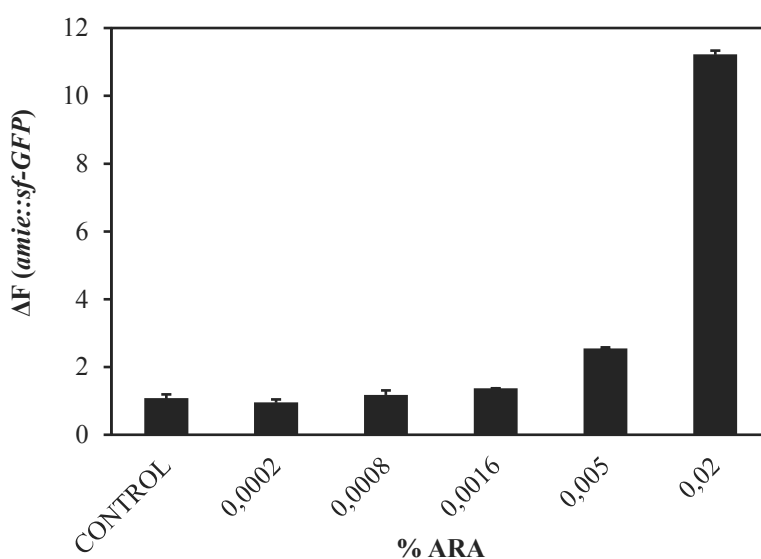
**Figura 4.40.** Crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *crcZ* con el plásmido que contiene el constructo *amiE::sf-GFP* (pCC1) y el plásmido control (pBBR). Las cepas fueron cultivadas en 20 mL de LB suplementado con 40 mM de acetamida y cloranfenicol (0,4 mg/ml), Ex. 485nm – Em. 515 nm, ganancia de 60.

Los estudios relacionados con la transferencia de material genético mediante MVs en *Pseudomonas aeruginosa*, muestran que ésta sucede a una baja frecuencia (Tran & Boedicker, 2017). Es por este motivo que se decidió estudiar la sensibilidad del sistema reportero mediante la expresión controlada del gen *crcZ* en la cepa PAO1 $\Delta$ *crcZ*, transformada con el plásmido pCC1. Con este propósito, el gen *crcZ* fue insertado en el plásmido pKH6 que permite la expresión del sRNAs controlada por un promotor inducible por arabinosa (pBAD *promoter*), obteniendo el plásmido pCC3.

Así pues, la cepa de PAO1 $\Delta$ *crcZ* transformada con los plásmidos pCC1 y pCC3 fue cultivada en LB y en presencia de diferentes concentraciones de arabinosa (%) (0,0002 - 0,0008 - 0,0016 - 0,005 - 0,02) y se calculó la síntesis de *sf-GFP* mediante la determinación de la fluorescencia a las 2, 4 y 6 horas (Fig. 4.41). Es importante tener en cuenta que la concentración máxima de inducción empleada en el ensayo fue 10 veces menor que la máxima recomendada por el fabricante (0,2%).

Tal como esperábamos la expresión de *sf-GFP*, asociada al constructo *amiE::sf-GFP*, fue proporcional a la cantidad de arabinosa del medio, ya que una mayor concentración de arabinosa comportaba un incremento proporcional en la señal de fluorescencia emitida en todos los tiempos analizados (Fig. 4.41). Sin embargo, a las concentraciones más bajas ensayadas de arabinosa de 0,0002% y 0,0008%, no se apreciaron incrementos en la

fluorescencia respecto la cepa control en ninguno de los puntos muestreados. Mientras que a la concentración superior de inducción de 0,02% se detectó un incremento de fluorescencia 11 veces superior en la cepa inducida respecto al control, a las 6 horas de inducción. Por otra parte, en las determinaciones realizadas a las dos horas solamente se detectó un incremento de la fluorescencia en los puntos inducidos con la mayor concentración de arabinosa (resultado no mostrado).



**Figura 4.41. Determinación de la sensibilidad del sistema reportero *amiE::sf-GFP*.** En la gráfica se muestra la fluorescencia emitida a las 6 h de incubación por la cepa *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta$ *crcZ* transformada con el plásmido pCC1 y pCC3 e incubada con distintas concentraciones de arabinosa. Ex. 485nm – Em. 515 nm, ganancia de 60.

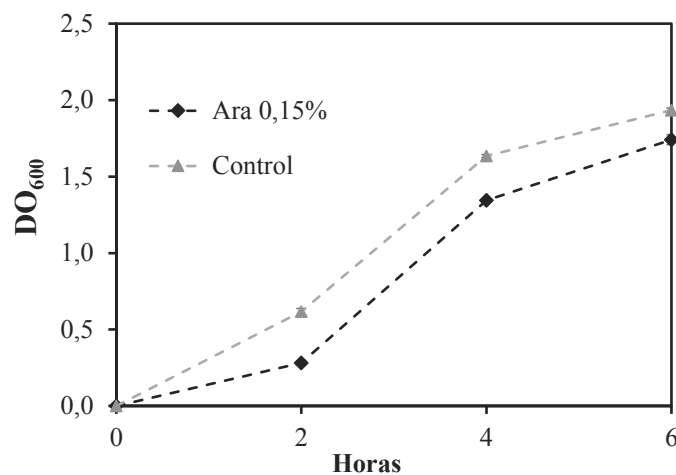
Los datos obtenidos sobre la sensibilidad del sistema reportero muestran que sólo se detectó una fluorescencia significativa tras una inducción de 6 horas al utilizar un 0,02% de arabinosa y no a concentraciones inferiores.

#### 4.8.1.2 Obtención de MVs después de la inducción con arabinosa de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 salvaje con el plásmido pCC3.

Con el objetivo de incrementar la concentración de CrcZ en MVs y así tener más posibilidades de detectar la captación de MVs por parte de la cepa PAO1 $\Delta$ *crcZ*, se decidió sobreexpresar en la cepa salvaje el gen *crcZ* presente en el plásmido pCC3. Para ello, se transformó la cepa PAO1 salvaje con el plásmido pCC3 y se comparó el crecimiento de la cepa transformante bajo una inducción de arabinosa del 0,15% y sin inducción.

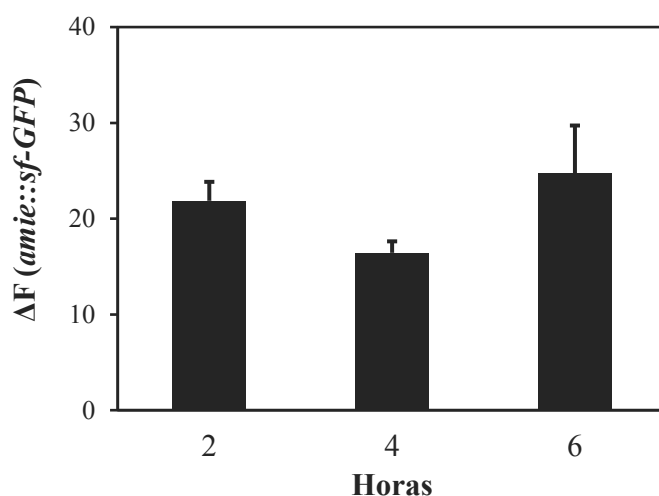
El crecimiento de la cepa transformada inducida y no inducida se monitorizó hasta 6 horas mediante el seguimiento de la DO y la fluorescencia emitida por el constructo *amiE::sf-GFP*. Las cepas fueron cultivadas en las mismas condiciones en las que se obtienen vesículas, es decir, en TSB irradiado empleando matraces muescados y los cultivos fueron inducidos con arabinosa a tiempo cero.

Se observó un enlentecimiento en el crecimiento de la cepa inducida respecto a la cepa sin inducir (Fig. 4.42). Por otra parte, la relación de la fluorescencia emitida entre la cepa inducida y no inducida no cambió significativamente en los tres puntos de toma de muestra. Este resultado indicaría que un incremento del tiempo de inducción a una concentración fija de arabinosa no conllevaría una mayor expresión de *crcZ* de la cepa inducida respecto a la cepa control (Fig. 4.43).



**Figura 4.42.** Efecto en el crecimiento de la sobreexpresión de *CrcZ* en la cepa *P. aeruginosa* PAO1 salvaje con el plásmido pCC3. La inducción con arabinosa se realizó a tiempo 0 y el seguimiento del crecimiento se realizó mediante la DO 600 nm.





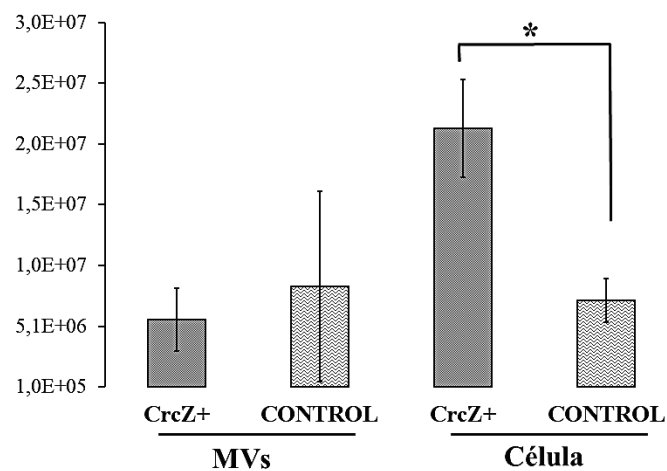
**Figura 4.43. Incremento de la fluorescencia de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 transformada con pCC3 e inducida por arabinosa.** La cepa transformada inducida presentó ~20 veces más fluorescencia que sin inducir en los tres tiempos evaluados.

Así pues, se estableció que un tiempo de inducción de 2 horas en las condiciones de obtención de vesículas era suficiente para producir un incremento en la expresión de CrcZ. También, se decidió emplear el menor tiempo posible de inducción, para afectar lo mínimo al crecimiento óptimo de la cepa.

A continuación, se procedió a aislar MVs producidas por la cepa *P. aeruginosa* PAO1 salvaje con el plásmido pCC3, en condiciones de inducción y sin inducir. Para ello, se incubaron 4 matraces de 2 L con 500 ml de TSB irradiado e inoculados al 1% con un preinóculo o/n de la cepa *P. aeruginosa* PAO1\_pCC3. Al alcanzar una DO ~ 1, dos matraces fueron inducidos con arabinosa a una concentración final de 0,15% mientras que los dos restantes fueron empleados como control. Los matraces fueron cultivados durante un máximo de 2 horas hasta alcanzar una DO de 1,7. Llegados a ese punto del crecimiento se separaron dos alícuotas de cultivo de cada matraz para la obtención del RNA celular y el resto del cultivo fue procesado siguiendo el protocolo de aislamiento de MVs.

Una vez aisladas, las MVs se trataron externamente con RNAsa y se lavaron con agua. A continuación, se calculó el LPS y se extrajo el RNA procedente de 30  $\mu$ g de LPS. Posteriormente, se trataron con DNAsa y se realizó la cuantificación con RT-qPCR para CrcZ de las muestras de RNA vesicular y RNA celular.

Las cuantificaciones mediante RT-qPCR de CrcZ en muestras de RNA vesicular y celular se muestran en la Figura 4.44. Se observó que las MVs obtenidas tras ser inducidas con arabinosa contenían un número ligeramente inferior de copias de CrcZ que las MVs control, aunque las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas. Contrariamente, las células inducidas presentaron una mayor expresión de CrcZ en comparación con las células control (*t-student*, p-valor < 0,001). Además, se calculó la relación entre el número de copias de CrcZ en MVs respecto el celular, obteniendo unos valores de  $0,26 \pm 0,06$  para las muestras inducidas y de  $1,3 \pm 0,39$  para las muestras control. Por lo tanto, la relación de CrcZ en MVs respecto al celular en las muestras inducidas era 5 veces menor que para las muestras control. El resultado indica que una inducción de CrcZ no conllevaría a un incremento del contenido del sRNA dentro de las MVs. Por lo tanto, se descartó el uso de MVs obtenidas tras la sobreexpresión de un CrcZ.



**Figura 4.44. Estudio comparativo de la expresión de CrcZ en MVs y células de *P. aeruginosa* PAO1, después de la inducción del sRNA con arabinosa.** No se observaron diferencias en el número de copias de CrcZ internalizadas en las MVs de la cepa inducida (CrcZ+), respecto la MVs control. Mientras que, a nivel celular, la cepa inducida presentaba un incremento de la expresión de CrcZ de casi más de un logaritmo respecto la cepa control. Así pues, un incremento celular de CrcZ no comporta un incremento del número de copias en las MVs. El experimento fue realizado por duplicado, con dos determinaciones para cada experimento (n=2,2).

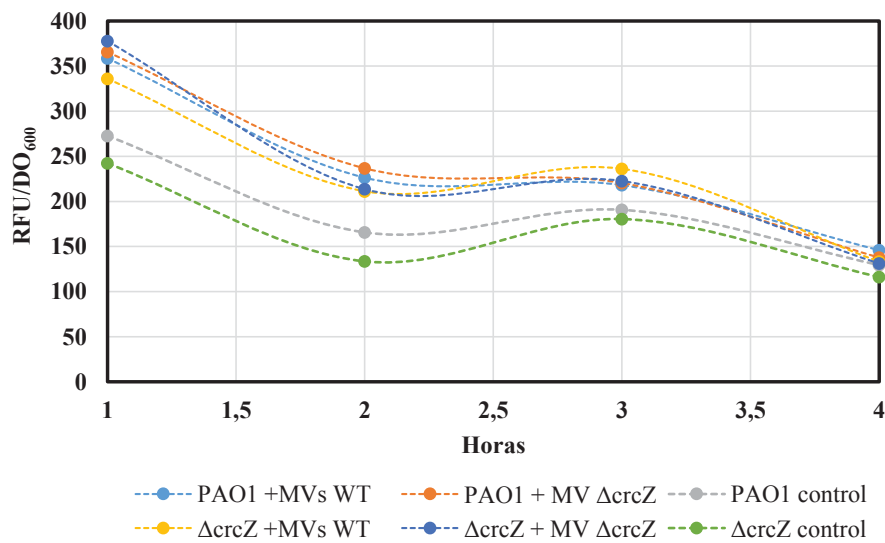
#### 4.8.1.3 Determinación de la transferencia con *CrcZ* en tubos.

Para la determinación de la transferencia de *CrcZ* en tubos, se siguió el protocolo empleado por Tran & Boedicker (2017) que fue utilizado para determinar la transferencia de plásmidos mediante MVs.

Para la realización del experimento, en primer lugar, se obtuvieron MVs de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 salvaje y de *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *crcZ* transformadas con el plásmido pKH6 que confiere resistencia a gentamicina y así poder detectar la transferencia del plásmido como control de la captación de MVs por parte de la cepa receptora. Se aislaron MVs de cada cepa y fueron tratadas externamente con RNAsa.

Para la preparación de las células receptoras, se cultivaron la cepa *P. aeruginosa* PAO1 salvaje y *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *crcZ* transformadas con el plásmido pCC1 (*amiE::sf-GFP*) en matraces de 150 mL con 40 mL de medio suplementado con acetamida a 40 mM. A una DO de 0,2, las células fueron repartidas en tubos de vidrio con 4 mL del cultivo. A continuación, en cada tubo se añadieron MVs correspondientes a 12  $\mu$ g de proteína y se cultivaron a 37°C en agitación. A cada hora se tomaron muestras para calcular la DO y la fluorescencia derivada de la síntesis de la *sf-GFP*.

El experimento fue realizado en dos ensayos independientes, con dos réplicas para cada punto. Para finalizar, al cabo de 18 horas, dos alícuotas de 200  $\mu$ L de cada tubo fueron sembrados en placas de agar con gentamicina para detectar la presencia del plásmido pKH6 en las células receptoras.



**Figura 4.45. Seguimiento de la captación de MVs en la cepa *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ crcZ.** El seguimiento se hizo por emisión de fluorescencia asociada a la producción de GFP. Las cepas ensayadas fueron PAO1 y  $\Delta$ crcZ transformadas con el plásmido pCC1. Se añadieron MVs obtenidas de las cepas PAO1 y  $\Delta$ crcZ transformadas con el plásmido pKH6, con el fin de monitorizar la transferencia de DNA. También se añadieron muestras control sin MVs. Las cepas fueron cultivadas en tubos y se tomaron muestras cada hora. Los resultados muestran la fluorescencia del constructo *amiE::sf-GFP* normalizado respecto a la DO, los puntos expresan la media de dos experimentos independientes, con dos réplicas por cada punto (n=2,2).

No se pudo detectar ninguna diferencia en la fluorescencia de las muestras incubadas con MVs procedentes de la cepa salvaje en comparación con las muestras incubadas con MVs obtenidas de  $\Delta$ crcZ. Sin embargo, sí que se detectó una menor fluorescencia en las cepas que no contenían vesículas, sugiriendo que las MVs presentarían fenómenos de autofluorescencia. Tampoco se detectó transferencia del plásmido pKH6 mediada por MVs, al no observar colonias en los cultivos en placas con antibiótico.

#### 4.8.1.4 Determinación transferencia de *CrcZ* por MVs en placas de micropocillos.

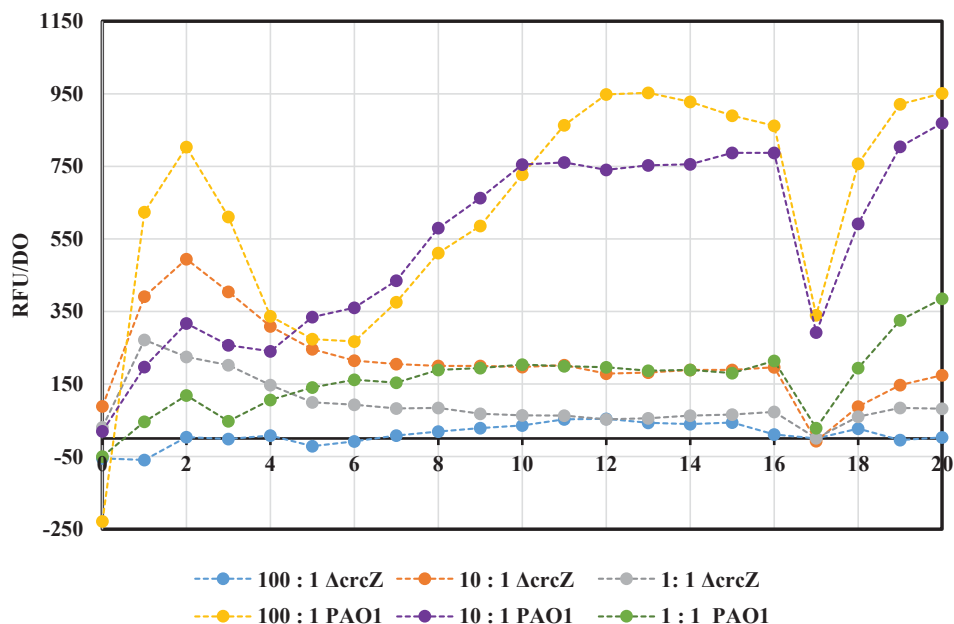
Al no conocer la cantidad de MVs y tampoco saber si su captación podía variar según la fase de crecimiento de la cepa receptora, se decidió cultivar la cepa en placas de micropocillos para poder probar distintas condiciones y facilitar la monitorización de la fluorescencia emitida en las distintas muestras. La preparación de las suspensiones

bacterianas y la disposición de las muestras en la placa se detallan en Material y Métodos 20.7.2.

Para la transferencia se decidió incubar la bacteria en presencia de distintas proporciones de MVs por célula, concretamente a 100:1, 10:1 y de 1:1 MVs. Para determinar el número de MVs en la suspensión se decidió extrapolar la concentración de LPS a los datos obtenidos en las cuantificaciones de MVs por citometría de flujo explicados anteriormente en el apartado de Resultados 4.5.1.1 y así estimar el número de MVs. A cada pocillo, se añadieron 3  $\mu$ l de una concentración estimada de  $10^{10}$  MVs/mL. Las cepas ensayadas fueron tanto *P. aeruginosa* PAO1 como PAO1  $\Delta$ *crcZ* transformadas con el plásmido pCC1. Todos los cultivos se realizaron en LB ya que la bacteria crece más lento que con TSB y se suplementaron con acetamida. Las MVs empleadas se obtuvieron de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 transformada con el plásmido pKH6.

Las placas una vez preparadas se cultivaron a 37°C sin agitación en el lector de placas, y se monitorizó la fluorescencia y la DO de las muestras cada hora. Como control se añadieron MVs lisadas y también una muestra sin vesículas. Las fluorescencias emitidas fueron normalizadas por la DO del cultivo.

En la Figura 4.46 se muestran los incrementos de fluorescencia detectados en cada condición ensayada. Estos fueron calculados restando la fluorescencia emitida por las muestras control de MVs lisadas menos la fluorescencia emitida por las cepas con MVs. Como resultado, sólo se detectaron incrementos en las muestras 100:1 de PAO1 y 10:1 de  $\Delta$ *crcZ* desde la primera hora de cultivo (Fig 4.46, puntos amarillos y naranjas respectivamente). A medida que aumentaron las horas de incubación, se detectó también una mayor fluorescencia en las muestras 100:1 PAO1 (Fig 4.46, puntos amarillos) y 10:1 PAO1 (Fig 4.46, puntos lilas).

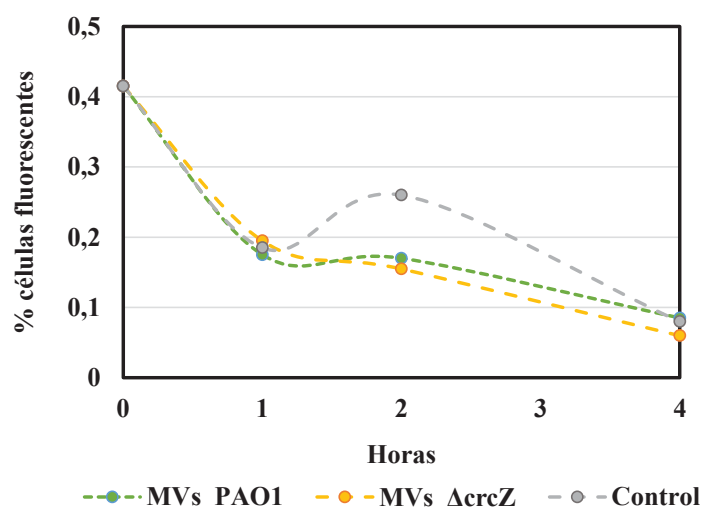


**Figura 4.46. Incrementos de fluorescencia de las muestras con MVs respecto a MVs lisadas, incubadas en una microplaca a 37°C durante 20 horas. A las 17 horas se detecta un descenso de la fluorescencia tras la eliminación del agua de condensación acumulada en la tapa de la placa de 96 pocillos durante el cultivo de la placa dentro del lector.**

El gráfico muestra un incremento en la fluorescencia en algunos casos de más de 1000 unidades respecto su control. Sin embargo, a las 17 horas de incubación se observó un descenso en el incremento de la fluorescencia debido a la eliminación del agua de condensación acumulada en la tapa de la placa de micropocillos. Esta observación indicaría que el aumento en la fluorescencia podría ser generado por un artefacto del método de determinación en el ensayo.

Se decidió confirmar los resultados obtenidos empleando citometría de flujo. Para ello, se cultivó *P. aeruginosa*  $\Delta$ crcZ hasta una DO de 0,2 ( $10^8$  ucf/mL) y el cultivo fue dividido en alícuotas de 100  $\mu$ l. A continuación, se añadieron las MVs en una proporción 100:1 (MV por célula) y se emplearon MVs obtenidas tanto de *P. aeruginosa* PAO1 salvaje como de *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ crcZ, utilizando éstas últimas como MVs control negativo de la transferencia. Además, también se cultivó *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ crcZ sin la presencia de MVs. La fluorescencia fue determinada de forma puntual a las 1, 2 y 4 horas de cultivo. El experimento se realizó por duplicado y con dos réplicas técnicas por cada

determinación. Los resultados fueron filtrados mediante FSC frente SSC y fueron analizados un total de 25.000 eventos para cada punto. Los resultados recogidos en la Figura 4.47 muestran el total de células fluorescentes detectadas en cada punto.



**Figura 4.47. Cuantificación del número de células que expresan GFP después de su incubación con MVs mediante citometría de flujo.** Las MVs procedentes de *P. aeruginosa* PAO1 salvaje y de *P. aeruginosa* PAO1Δ*crcZ* fueron incubadas con la cepa *P. aeruginosa* PAO1 y PAO1Δ*crcZ* y se monitorizó la fluorescencia a las 1, 2 y 4 horas. Como control se empleó una muestra de PAO1Δ*crcZ* sin vesículas. Los resultados muestran el valor medio de dos experimentos independientes con dos réplicas (n=2,2).

En general, se detectó un número bajo de bacterias fluorescentes en todas las muestras procesadas, emitiendo fluorescencia alrededor del 0,4% del total de células analizadas. Al añadir MVs se observó un descenso de la fluorescencia en las muestras que contienen MVs. En las condiciones ensayadas, no se detectó un incremento de la fluorescencia y por lo tanto, se debe considerar que la transferencia fue negativa.

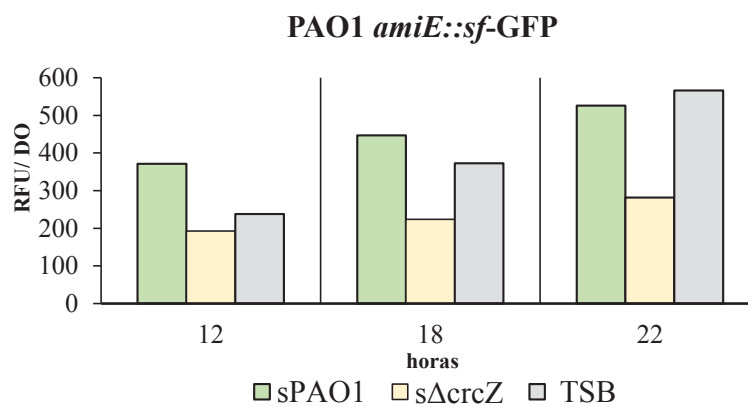
#### 4.8.1.5 Determinación de la transferencia con *CrcZ* a partir de sobrenadantes.

En los resultados expuestos anteriormente, se observó como en el punto de DO 2,3 de la curva de crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1, las MVs desaparecían del sobrenadante y este hecho presuntamente podría deberse a que pudieran ser reabsorbidas por las propias células del cultivo. Teniendo en cuenta esta observación, se decidió realizar un

experimento en el que se pusieron en contacto los sobrenadantes obtenidos del cultivo de *P. aeruginosa* PAO1 salvaje y *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *crcZ*, con las cepas PAO1 y PAO1  $\Delta$ *crcZ* transformadas con el constructo reportero *amiE::sf-GFP* respectivamente, tal como se indica en Material y Métodos 20.7.3.

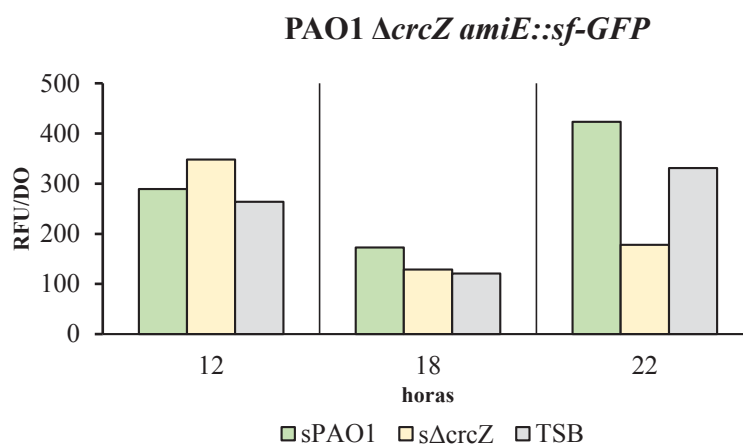
Los sobrenadantes filtrados de ambas cepas, fueron inoculados con la cepa *P. aeruginosa* PAO1 o *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta$ *crcZ* transformadas con *amiE::sf-GFP* y se dejaron crecer, en tubos de 4 mL. Como control del crecimiento ambas cepas fueron cultivadas en TSB. Se tomaron tres muestras a 12, 18 y 22 horas, ya que el crecimiento de las cepas de *P. aeruginosa* en tubos requería de tiempos de incubación más largos. La fluorescencia y DO fueron medidas en microplacas con un volumen de determinación de 100  $\mu$ L.

En general, se detectó una emisión de fluorescencia mayor en las cepas cultivadas en el sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1 salvaje (Fig 4.47 y Fig 4.48, barra verde), respecto a la misma cepa crecida en el sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *crcZ* (Fig 4.47 y Fig. 4.48, barra amarilla), en los tres puntos de toma de muestra. El experimento fue realizado por duplicado, con dos réplicas técnicas para cada uno.



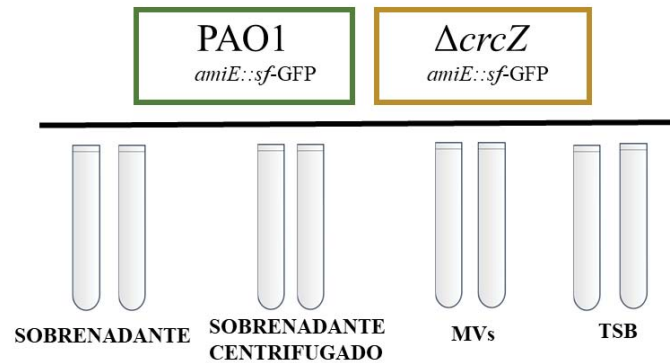
**Figura 4.47. Fluorescencia emitida por *P. aeruginosa* PAO1 *amiE::sf-GFP* incubada con sobrenadantes de PAO1 salvaje (sPAO1), PAO1  $\Delta$ *crcZ* (s $\Delta$ *crcZ*) y el control (TSB).** En la gráfica se muestran el promedio de las medidas de la fluorescencia relativa normalizada respecto a la DO en cada uno de los tiempos de toma de muestra para la cepa PAO1 *amiE::sf-GFP* incubada en cada condición. (n=2,2)





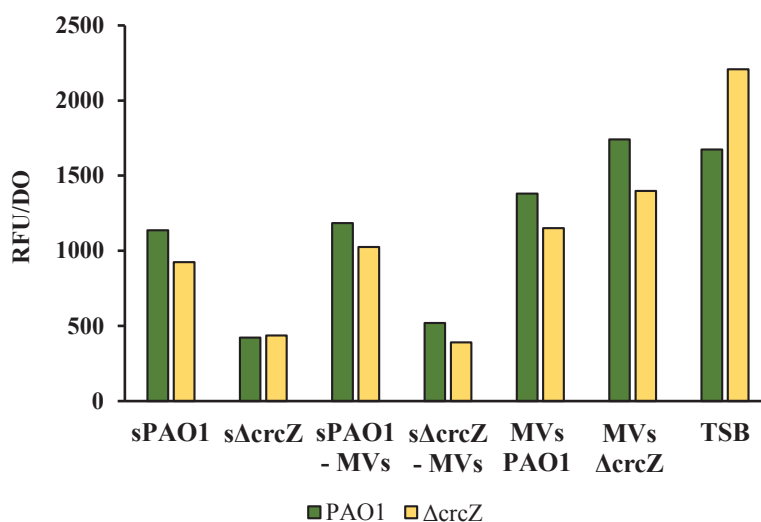
**Figura 4.48. Fluorescencia emitida por *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ crcZ amiE::sf-GFP incubada con sobrenadantes de PAO1 salvaje (sPAO1), PAO1  $\Delta$ crcZ (s $\Delta$ crcZ) y el control (TSB). En la gráfica se muestran el promedio de las medidas de la fluorescencia relativa normalizada respecto a la DO en cada uno de los tiempos de toma de muestra para la cepa PAO1 amiE::sf-GFP incubada en cada condición. (n=2,2)**

Con el fin de confirmar que el incremento en la fluorescencia de los cultivos crecidos con el sobrenadante obtenido en el punto de la curva de DO 1,6 era producido por la presencia de MVs y no por la presencia de algún compuesto soluble secretado por la bacteria directamente al sobrenadante, se procedió a repetir el experimento anterior, pero añadiendo dos controles al experimento (Fig. 4.49). El primer control fue el sobrenadante desprovisto de MVs y el segundo las MVs aisladas y resuspendidas en TSB. Para su preparación, los sobrenadantes fueron centrifugados a 40.000 g para separar las MVs, y una vez desprovistos de MVs se guardaron en nevera y las MVs fueron resuspendidas en el volumen inicial con TSB estéril. Las cepas fueron cultivadas en tubos en un volumen final de 4 mL y se tomaron muestras a las 12, 18 y 22 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.49.



**Figura 4.49. Diagrama ilustrativo de las condiciones del experimento.** La cepa *P. aeruginosa* PAO1 y PAO1  $\Delta crcZ$  con *amiE::sf-GFP* se cultivaron con sobrenadante, sobrenadante centrifugado y por lo tanto desprovisto de MVs, con MVs resuspendidas en TSB. Cada muestra fue obtenida tanto de la cepa salvaje como de la mutante. Por último, también se cultivaron con el control de TSB.

Se confirmaron los resultados anteriores, donde se observó que tanto la cepa salvaje como la mutante, crecidas en los sobrenadantes de PAO1 salvaje (Fig 4.50, sPAO1), presentaban mayor fluorescencia que las mismas cepas crecidas en el sobrenadante de  $\Delta crcZ$  (Fig 4.50, s $\Delta crcZ$ ). Este mismo comportamiento también se observó en aquellas muestras cultivadas en sobrenadantes libres de MVs. Por el contrario, aquellas muestras en las que las cepas transformadas se cultivaron con MVs aisladas de PAO1 o PAO1  $\Delta crcZ$ , se detectó mayor fluorescencia en las muestras crecidas con MVs de PAO1  $\Delta crcZ$ . Por lo tanto, se confirmaría que el incremento en la emisión de fluorescencia de las bacterias crecidas en sobrenadantes de PAO1 se debería a algún compuesto soluble en el sobrenadante, en vez de estar asociado a la presencia de MVs.



**Figura 4.50, Gráfica donde se muestra la fluorescencia emitida a las 22 horas por el constructo *amiE::sf-GFP* en la cepa *P. aeruginosa* PAO1 salvaje y *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *crcZ* crecida en distintas condiciones.** Sobrenadante de PAO1 (sPAO1), sobrenadante de PAO1  $\Delta$ *crcZ* (s $\Delta$ *crcZ*), sobrenadante sin MVs de PAO1 (sPAO1- MVs), sobrenadante PAO1  $\Delta$ *crcZ* sin MVs (s $\Delta$ *crcZ*- MVs), MVs de PAO1 resuspendidas en TSB (MVs PAO1), MVs de PAO1  $\Delta$ *crcZ* (MVs s $\Delta$ *crcZ*) resuspendidas en TSB, y por último, las cepas crecidas en TSB.

Cabe indicar que la cepa *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *crcZ* al cultivarla en nuestro laboratorio, repetidamente presentaba la capacidad de revertir el fenotipo, a veces incluso en pocas horas y emitiendo en ocasiones más fluorescencia que la cepa salvaje (Fig 4.50, TSB). Asimismo, la cepa presentaba un comportamiento inestable que dificultó la realización de los experimentos. Por esta razón se decidió cambiar la cepa reportera de estudio a *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *rsmZ* $\Delta$ *rsmY*.

#### 4.8.2 Evaluación de la transferencia de RsmZ y RsmY por MVs.

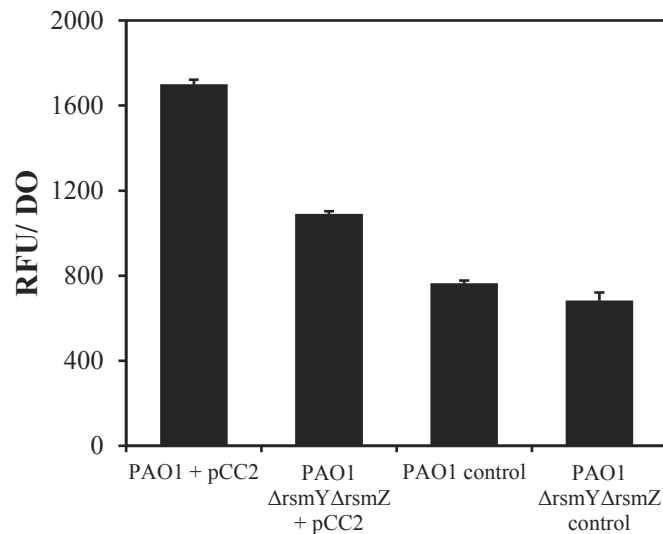
RsmZ y RsmY son dos sRNAs de *P. aeruginosa* PAO1 que participan en el sistema de señalización intracelular Gac/Rsm y están implicados en la transición de la fase exponencial a la estacionaria. La transcripción de estos dos sRNAs está controlada por el sistema de dos componentes GacS/GacA que son activados cuando el cultivo presenta una elevada densidad óptica, promoviendo la transcripción de los dichos sRNAs que se unirán a la proteína RsmA, liberando el RBS y regulando positivamente la expresión de aquellos mRNAs implicados en la producción de señales del QS y de factores de virulencia como la cianuro de hidrógeno (HCN), elastasas o proteasas (Kay et al., 2006).

Tal como se observó en el estudio transcriptómico comparativo de la expresión de RNAs en la célula respecto al RNAs de las MVs, RsmZ y RsmY presentan una expresión superior en MVs respecto a la célula ( $\log_2\text{-FC} > 4$ ). Así pues, se decidió emplear como reportero el mutante PAO1  $\Delta rsmZ\Delta rsmY$  descrito por Kay y colaboradores (2006), basado en la expresión del grupo de genes *hcnABC* encargados de la biosíntesis de HCN. Como este conjunto de genes está regulado directamente por GacA, para poder tener una expresión constante del constructo, el promotor inducible por GacA fue substituido por el promotor constitutivo *tac* y así, incrementar la concentración del mRNA en el citoplasma.

#### 4.8.2.1 Construcción y validación de la fusión traduccional *hcnA::sf-GFP*.

En este estudio se empleó como reportero el constructo *hcnA::lacZ* incluido en el plásmido pME3843, bajo el control del promotor pTAC (Pessi et al., 2001). Para conseguir el reportero fluorescente, se clonó la *sf-GFP* en el mismo marco de lectura que los primeros 9 aminoácidos de la proteína HcnA tal como se describe en Material y Métodos, obteniendo el plásmido pCC2.

En primer lugar se comparó la expresión de la cepa mutante PAO1  $\Delta rsmY\Delta rsmZ$  con la cepa PAO1 salvaje para ver la diferente expresión del constructo *hcnA::sf-GFP* entre ambas cepas. Tal como se observa en la Figura 4.51 la expresión media de fluorescencia para la cepa salvaje fue de ~1700 RFU normalizadas por la DO, mientras que para PAO1  $\Delta rsmY\Delta rsmZ$  fue de ~1000 RFU respecto la DO. Así pues, se confirmó el fenotipo de la cepa descrito por Kay y colaboradores (2006), en que una delección de ambos sRNAs conduciría a una expresión menor de *sf-GFP*, aunque existiría una importante expresión basal en la cepa delecionada. Para el control de la autofluorescencia, las cepas de *P. aeruginosa* fueron transformadas con el plásmido pME6010 que es el plásmido original del que deriva pME3843 (Fig 4.52).



**Figura 4.52. Expresión del constructo *hcnA::sf-GFP* incluido en el plásmido pCC2.** Las cepas ensayadas fueron *P. aeruginosa* salvaje (PAO1) y *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta rsmY\Delta rsmZ$ , ambas transformadas con el plásmido pCC2. Como control, ambas cepas fueron transformadas con el plásmido pME6010.

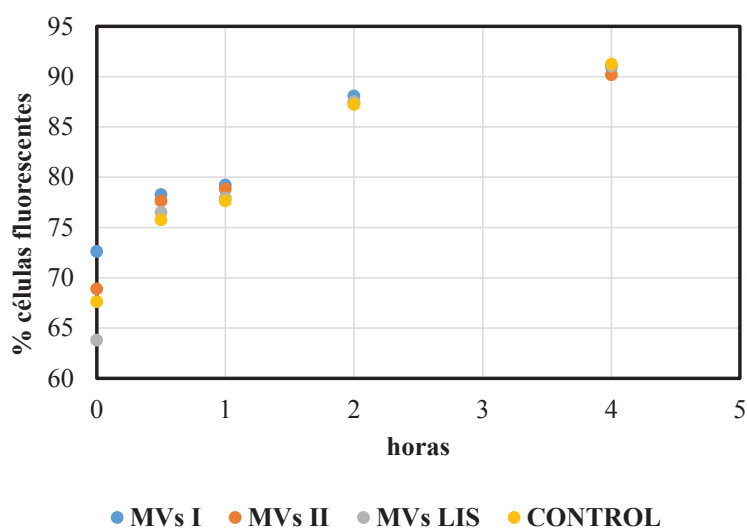
#### 4.8.2.2 Análisis de la transferencia de *RsmYZ* mediada por MVs.

Al observar que en la cepa mutante hay una importante expresión basal del constructo *hcnA::sf-GFP* decidimos analizar la captación de MVs por la cepa PAO1  $\Delta rsmY\Delta rsmZ$  mediante citometría con el fin de tener una mayor sensibilidad.

Así pues, un cultivo o/n de *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta rsmY\Delta rsmZ$  fue inoculado en medio fresco de TSB irradiado y se cultivó hasta una DO de 0,2. A continuación se dividió el cultivo en alícuotas de 3 mL en tubos de vidrio y se añadieron MVs en una proporción 100:1 (MVs/célula). Como control negativo de la transferencia se emplearon muestras de MVs lisadas y fueron añadidas en la misma proporción 100:1. También dejamos como control un tubo en el que no se añadieron vesículas. Se emplearon dos muestras de MVs independientes aisladas a una DO de 1,6 en dos días distintos. Tomamos muestra a los tiempos 0, 0,5, 1, 2, 4 horas y los cultivos se mantuvieron en agitación a lo largo del experimento. Los datos que se muestran en la Figura 4.53, fueron obtenidos en 4 experimentos independientes con dos réplicas técnicas cada uno.

Para la citometría el número de eventos fueron filtrados mediante FSC frente SSC y fueron analizados un total de 25.000 eventos para cada punto. En los tiempos analizados

no se observó un incremento en el número de células en las muestras que contenían MVs (Fig 4.53, MVs I y MVs II) respecto a los controles de las muestras con MVs lisadas (Fig 4.53, MVs LIS) y las células control. No obstante, si se observaron diferencias muy pequeñas en la fluorescencia a tiempo cero y a los 30 minutos de cultivo. No obstante, la desviación estándar de cada punto era considerablemente grande (dato no mostrado), haciendo imposible asegurar que estas diferencias pequeñas pudieran ser originadas por una internalización de MVs por la cepa *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta rsmY\Delta rsmZ$ .



**Figura 4.53. Recuento de células fluorescentes mediante citometría para evaluar la captación de MVs.** PAO1  $\Delta RsmY\Delta RsmZ$  fue cultivada con dos muestras independiente de MVs obtenidas de la cepa PAO1 salvaje (MVs I y MVs II) y con una muestra de MVs lisadas (MVs Lis) como control. Todas ellas, fueron añadidas a un cultivo de PAO1  $\Delta RsmY\Delta RsmZ$  de DO  $\sim$  0,2 a una proporción 100:1 de MVs/célula. Además, se dejaron unas muestras de cultivo sin MVs como control. La cepa fue cultivada en tubos de 3 mL en una agitación de 165 rpm durante 4 horas. A los tiempos asignados se tomó muestra y el recuento de células se realizó mediante citometría. Los resultados muestran las medias de 4 experimentos independientes (n=4,2).



## **V. DISCUSIÓN**





## V. DISCUSIÓN

La descripción de la existencia de las vesículas membrana fue posible gracias al desarrollo de la microscopía electrónica de transmisión (TEM), cuando Work y colaboradores en 1966 observaron los sobrenadantes procedentes de un cultivo de un mutante de *Escherichia coli* deficiente en el uso de lisina. En ese momento, describieron las vesículas como unas estructuras esféricas formadas por una bicapa lipídica y que englobaban un material de mayor densidad electrónica que el medio, descartando que estas estructuras fueran simples “sacos vacíos” o fragmentos de membranas recircularizadas (Kulp & Kuehn, 2010).

Desde entonces, se han publicado un gran número de artículos centrados en el estudio de las OMVs, y todos ellos coinciden en definirlos como estructuras multifuncionales implicadas en diversos procesos biológicos y que se originan a partir de la membrana externa bacteriana y encapsulan material procedente del periplasma. Por lo tanto, las vesículas estarían compuestas exclusivamente por contenido de la OM, junto con proteínas del periplasma. Sin embargo, este modelo de vesícula no consigue explicar cómo componentes del citoplasma (CC) y de la membrana interna (IM) puede estar internalizados en vesículas como se describe en numerosos estudios (Jan et al, 2017).

En los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas de microscopía electrónica que permiten la visualización de los especímenes biológicos en un estado lo más cercano posible a la realidad, permitiendo la descripción de nuevas estructuras bacterianas y la observación de sus matrices extracelulares (Beveridge, 1999; Oikonomou, et al., 2016). Durante años, nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio de nuevas especies microbianas procedentes de la Antártida adaptadas al frío, observando la presencia de abundantes OMVs en sus matrices extracelulares mediante TEM de cortes ultrafinos obtenidos después de criofijación y criosustitución (Frias et al., 2010).

Al visualizar por TEM cortes ultrafinos de la bacteria antártica *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup>, se detectó la presencia de un tipo distinto de OMV formada por una doble bicapa lipídica y que englobaba un material de elevada densidad electrónica en su interior con una apariencia similar al contenido del citoplasma bacteriano. En base a esta observación, se planteó un estudio cuyo objetivo principal fue la caracterización de un nuevo tipo morfológico de vesícula, producido a partir de la protuberancia de la OM y la IM encapsulando contenido citoplasmático. Posteriormente, se determinó si este nuevo tipo

de vesícula de membrana también se encontraba en cepas patógenas gramnegativas en las que se había descrito previamente la presencia de contenido del citoplasma asociado a sus vesículas. Las tres cepas incluidas en el estudio fueron *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Acinetobacter baumannii* AB41.

Para evitar confusiones y facilitar la lectura, en adelante las nuevas vesículas se designarán con el nombre de Vesícula de Membrana Externa e Interna (*Outer-inner membrane vesicle*, O-IMVs) para diferenciarlas de las clásicas OMVs. Para referirnos al conjunto total de vesículas de membrana lo indicaremos con las siglas MVs.

### **1. CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO TIPO DE VESÍCULA EN BACTERIAS GRAMNEGATIVAS.**

Con el objetivo de determinar la existencia de un nuevo tipo de MVs en bacterias gramnegativas, las cepas se visualizaron mediante TEM después de HPF-FS, ya que se trata de una técnica de referencia para la caracterización estructural de bacterias y sus matrices extracelulares. Además, esta técnica presenta la ventaja de permitir visualizar la muestra con un alto grado de conservación y a temperatura ambiente, favoreciendo el análisis rápido de centenares de campos y facilitando la observación de aquellos eventos que puedan ocurrir en menor frecuencia (Hurbain & Sachse, 2011).

Durante las observaciones de TEM de cortes ultrafinos obtenidos después de HPF-FS de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> y de las tres cepas patógenas cultivadas en medio sólido, se observó la formación de dos tipos de MVs. Las OMVs convencionales, formadas por una sola bicapa lipídica y que contenían un material en su interior de baja densidad electrónica, junto con las vesículas con una doble bicapa lipídica, O-IMVs. Éstas últimas, contenían en su interior un material de elevada densidad electrónica similar al del citoplasma bacteriano. En todos los cortes analizados las vesículas dobles fueron observadas siempre en menor proporción que las convencionales.

Además, tanto en *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> como en *N. gonorrhoeae*, se pudo observar el momento justo en el que se secretaba una vesícula con doble bicapa, confirmando que la doble envuelta procedía de la OM y de la IM, mientras que el material de elevada densidad electrónica era contenido citoplasmático. En ambos casos, las vesículas en formación no se visualizaban con una estructura totalmente esférica y nítida, así en *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>

mostraban un aspecto alargado, mientras que en *N. gonorrhoeae*, las membranas celulares perdían cierto detalle en el lugar donde se estaba originando la O-IMV. Sin embargo, es importante considerar que prácticamente no existen imágenes en la literatura donde se muestre el momento en que una OMVs está siendo secretada (Beveridge, 1999; Deatherage et al., 2009; Ercoli et al., 2015; Kadurugamuwa & Beveridge, 1995). Por lo tanto, es un hecho destacable el haber podido captar éstas imágenes, a pesar de que la técnica de TEM después de HPF-FS no está exenta de ciertos artefactos. Un artículo publicado por Dohnalkova y colaboradores (2011) apoya la formación de estas nuevas vesículas ya que aporta una imagen nítida de Cryo-EM del momento de formación de una vesícula que arrastra OM e IM en *Shewanella oneidensis* MR-1, aunque el objetivo del estudio era otro. Así pues, las imágenes de las nuevas O-IMVs que se muestran en este trabajo no serían fruto de artefactos producidos durante la preparación de la muestra mediante HPF-FS para ser visualizada por TEM.

Esta comúnmente aceptado que la liberación de las MVs tienen lugar en aquellas células que se dividen activamente (Kulp & Kuehn, 2010). Después de visualizar centenares de campos, se determinó que la formación de este nuevo tipo de vesícula no se originaba específicamente en zona de formación del septo de división. Las O-IMVs se observaron en los espacios intercelulares de células que presentaban una estructura intacta, con una forma bacilar y unos citoplasmas uniformes. Así mismo, se descartó que las O-IMVs fueran originadas por una incorrecta división bacteriana que podría dar lugar a una célula pequeña o “*minicell*” (Farley et al., 2016). Por otra parte, el hecho de que las bacterias presentes en la muestra mostrasen una estructura celular conservada y un material capsular consistente, indicaba que la preparación de la muestra fue correcta y descartaba que la observación de la O-IMVs fuera un artefacto generado por la técnica.

También se observaron muestras de MVs aisladas, visualizando de nuevo vesículas con doble membrana y contenido de elevada densidad electrónica. Asimismo, se pudo observar en algunas especies que sus MVs presentaban una capa continua de peptidoglicano (PG) entre ambas membranas.

Al mismo tiempo, la observación de MVs aisladas permitió descartar que la presencia de las O-IMVs fuera causado por el punto de corte de la muestra. Por ejemplo, el corte perpendicular de los polos bacterianos, podría generar la apariencia de O-IMVs (Fulsundar et al., 2014). Asimismo, las muestras de MVs fueron preparadas a partir de cultivos en fase exponencial descartando que la presencia de O-IMVs fuera debida a

restos de membranas celulares recircularizadas en forma de vesícula, tal como sugiere un nuevo mecanismo de vesiculación que se discutirá más adelante (Turnbull et al., 2016).

La TEM de cortes ultrafinos obtenidos tras HPF-FS, no está exenta de artefactos ya que requiere la sustitución del agua de la muestra por disolventes y su posterior inclusión en resinas para permitir el corte y tinción con metales pesados. Actualmente, para poder visualizar los especímenes biológicos en un estado lo más cercano a su estado natural, se emplea la Cryo-EM, que permite la observación directa de especímenes “enteros”, en su estado normal de hidratación y sin la necesidad de ser sometidos a ningún tipo de procesamiento más allá de la vitrificación, evitando la generación de artefactos (Pilhofer, et al., 2010).

Inicialmente, se visualizaron mediante Cryo-EM muestras de suspensiones bacterianas enriquecidas en MVs que fueron preparadas a partir de las tres cepas patógenas. Las observaciones confirmaron que las tres cepas patógenas secretaban los dos tipos de MVs. En el caso de las OMVs mostraron la estructura típica de una sola capa externa con un material de baja densidad a los electrones en su interior. Por el contrario, las nuevas O-IMVs estaban compuestas por una doble capa que presentaba la misma apariencia que la OM e IM de la célula. En su interior se pudo observar un contenido de elevada densidad electrónica, similar al del citoplasma. Incluso en algunos casos, se pudo observar perfectamente la presencia, en el interior de las O-IMVs, de un contenido con una apariencia muy similar a la de los ribosomas bacterianos. Por último, en todas las muestras criofijadas por PF las células presentaban una estructura bien conservada y no se observaron restos celulares o de desintegración celular, descartando definitivamente que la presencia de las O-IMVs fuera originada por la rotura de las bacterias.

Por último, para poder determinar el diámetro y la frecuencia de secreción de las O-IMVs respecto las OMVs, se observaron suspensiones de MVs aisladas mediante Cryo-EM. El diámetro medio de las O-IMVs fue ligeramente superior al de las OMVs convencionales y se estableció una frecuencia de secreción de alrededor del 0,4% para *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>, de 0,5% para *Pseudomonas* PAO1, 0,2% para *A. baumannii* y 1,2% para *N. gonorrhoeae*. De este resultado se desprende que para la mayoría de cepas analizadas la secreción de las O-IMVs representaría aproximadamente una proporción de 1 de cada 10<sup>3</sup> MVs. Esta baja proporción, junto con el empleo de técnicas poco adecuadas, sería la razón de que no hayan sido visualizadas con anterioridad.

En las tres últimas décadas se ha estudiado la capacidad de las MVs de participar en la transferencia de DNA. Por ejemplo, se ha descrito la transferencia de genes que codifican para factores de virulencia mediante MVs en *E. coli* O157:H7 (Domingues & Nielsen, 2017; Yaron et al., 2000). También se ha demostrado que las MVs procedentes de *N. gonorrhoeae* y de *A. baumannii* pueden vehiculizar plásmidos de resistencia a antibióticos (Dorward et al., 1989; Rumbo et al., 2011). Incluso, un estudio reciente, aborda la posibilidad de que el DNA asociado a vesículas pueda ser transferido a una célula huésped eucariota, integrándose en su genoma. El estudio propone que el DNA contenido en vesículas sería el responsable de la presencia de secuencias de DNA bacteriano encontrado en células neoplásicas (Bitto et al., 2017).

Está ampliamente demostrado que el DNA en vesículas se encuentra principalmente en su interior y no asociado a su superficie, ya que en gran medida es resistente a la acción de enzimas degradativos del medio (Dorward & Garon, 1990; Mashburn-Warren, et al., 2008). Por otra parte, un estudio reciente en MVs de *Pseudomonas aeruginosa* PA103  $\Delta pilA$  propone que el DNA incluido en vesículas procedería de zonas específicas del cromosoma bacteriano, sugiriendo la existencia de algún mecanismo selectivo para su inclusión en vesículas (Bitto et al., 2017). Con estos antecedentes, se procedió a determinar la cantidad de DNA encapsulado en las MVs de las cepas de estudio, obteniendo que para *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> el 80% del DNA se encontraba interiorizado en MVs, mientras que para las cepas patógenas los valores fueron próximos al 60%. De todos modos, este dato no explica cómo el DNA está siendo englobado en vesículas.

Tal como hemos explicado anteriormente, hasta el momento se han propuesto 3 mecanismos de inclusión del DNA en vesículas (Schwechheimer & Kuehn, 2015). El primero, propone que el DNA presente en el medio extracelular sería incluido en MVs por un mecanismo similar a la transformación bacteriana. El segundo, sugiere que el DNA sería transportado primero al periplasma bacteriano y posteriormente pasaría a las MVs. El último modelo, indica que cepas tratadas con antibióticos formarían unas vesículas alteradas al arrastrar las dos membranas e incorporarían contenido del citoplasma, aunque las imágenes aportadas en dicho estudio no presentaron suficiente resolución para confirmar este modelo (Kadurugamuwa & Beveridge, 1995).

El presente estudio, mediante un inmunomarcaje sobre cortes ultrafinos de MVs aisladas de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> y *N. gonorrhoeae* utilizando un anticuerpo específico contra DNA de doble cadena, ha demostrado que el DNA está mayoritariamente interiorizado en las

O-IMVs, confirmando que el material encapsulado en estas nuevas vesículas procede efectivamente del citoplasma bacteriano. Un hecho destacable, fue la observación de mayor marcaje en el interior de las O-IMVs de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> en comparación con *N. gonorrhoeae*. Esto podría atribuirse a la distinta naturaleza del material contenido en las vesículas de ambas cepas, o bien a que las O-IMVs de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> al presentar un diámetro superior, presentaban una mayor intensidad de marcaje. Sin embargo, desconocemos realmente la naturaleza o el significado biológico de esta observación.

En las muestras de MVs, además de DNA, también se ha descrito la presencia de proteínas del citoplasma. En el estudio proteómico de MVs de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> se identificaron un total de 46 proteínas de las cuales 32 eran de OM, 2 de periplasma, 3 IM y 2 del citoplasma. En las proteómicas realizadas por otros autores, se detectan un elevado número de proteínas del citoplasma y membrana interna, respecto a nuestro estudio en *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> (Lee J. et al. 2016). Probablemente, esta diferencia sea debida a que en el estudio de MVs purificadas de *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> tan solo se analizaron las bandas más abundantes. Como las proteínas mayoritarias en MVs, en cuanto abundancia suelen ser las procedentes de la OM, al escoger sólo aquellas bandas más abundantes se favoreció la identificación de proteínas del OM en detrimento de otras proteínas menos abundantes, pero más diversas como las que suelen asociarse a citoplasma.

Por ello, en *N. gonorrhoeae* se decidió realizar el estudio proteómico del perfil proteico total procedente de un gel 1D-SDS PAGE, describiendo 161 proteínas, de las cuales 30 procedían de la OM, 18 del periplasma, 22 de la membrana interna y 29 del citoplasma. Además, se identificaron 60 proteínas cuya localización no pudo ser determinada mediante el programa utilizado. Por lo tanto, se identificó una mayor diversidad de proteínas del citoplasma e IM en comparación con las proteínas de OM y periplasma, aunque las proteínas de OM fueran las más abundantes en vesículas. Los resultados obtenidos en *N. gonorrhoeae* en cuanto a la localización subcelular coinciden con los resultados observados en las proteómicas de MVs de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, (Choi et al., 2011; Kwon et al., 2009).

La detección de contenido proteico procedente del citoplasma en MVs se ha ido repitiendo en los distintos estudios publicados, aunque nunca se ha dado una explicación clara que justifique la presencia de dichos componentes (Jan, 2017). En los primeros estudios, la presencia de dichos componentes se atribuía a una mala preparación de la muestra. Sin embargo, todos los estudios proteómicos realizados hasta el momento han

detectado componentes del C e IM en sus análisis y atribuir su presencia a una mala preparación de la muestra, comporta invalidar los resultados obtenidos en todas las proteómicas realizadas hasta el momento. Además, si esta fuera la razón por la cual las proteínas del IM y C son detectadas, no explicaría como puede ser que algunas de las proteínas más abundantes del C no se encuentren en muestras de MVs ( Lee EY et al., 2007).

Otra alternativa propuesta para explicar la presencia de contenido del citoplasma, es que algunas de las proteínas identificadas en las MVs corresponden a proteínas multifuncionales o “moonlighting” y por lo tanto, pueden presentar más de una localización subcelular (Aguilera et al., 2013; Henderson & Martin, 2011). En la proteómica de *N. gonorrhoeae* se han identificado varias proteínas de este tipo, como la piruvato deshidrogenasa, enolasa, la chaperona DnaK y el Factor de Elongación Tu, aunque no todas las proteínas identificadas coincidirían con este criterio, como es el caso de las proteínas del complejo de ATP sintasas o algunas proteínas ribosomales (Henderson & Martin, 2011; Kunert et al., 2007).

De acuerdo a nuestros resultados, las proteínas del citoplasma podrían ser secretadas mediante su inclusión en las O-IMVs ya que éstas incluyen contenido citoplasmático, como DNA, tal como hemos demostrado con el inmunomarcaje.

En el estudio que se presenta, también se ha descrito por primera vez la encapsulación de ATP en muestras de MVs. Este descubrimiento podría ser notable ya que el ATP actúa como la moneda de cambio energético universal y está implicada en numerosos procesos biológicos, como por ejemplo, el transporte activo de sustancias o la síntesis de ácidos nucleicos (Hironaka et al., 2013). Al igual que sucede con otros componentes, la presencia de ATP en las vesículas sería controvertida, ya que se considera que el espacio periplásmico está desprovisto de ATP (Kulp & Kuehn, 2010). En consecuencia, la presencia de dicho componente sólo podría explicarse mediante su incorporación en O-IMVs, pero su funcionalidad está aún por determinar. Algunos autores, han descrito la secreción de ATP en los sobrenadantes de cultivos de varias cepas bacterianas y se ha planteado que el ATP extracelular podría estar implicado en procesos de comunicación intercelular entre células eucarióticas y procariotas (Mempin et al., 2013; Xi & Wu, 2010). Por otro lado, sería también interesante estudiar si otros componentes de naturaleza nucleotídica e implicados directamente en la señalización intracelular, pudieran estar



siendo secretados en vesículas, como sería el caso de los mensajeros secundario c-di-GMP o cAMP (Gomelsky, 2011).

Tal como se ha explicado anteriormente, el modelo de formación de las O-IMVs fue propuesto por Kurundurungawa & Beveridge (1995) quienes observaron la formación de un tipo complejo de MVs en *Pseudomonas aeruginosa* después de un tratamiento con gentamicina. Otro estudio realizado mediante Cryo-EM, mostró una vesícula con la misma estructura que las O-IMVs en *A. baumannii* cultivado en concentraciones subóptimas del antibiótico ceftazidima (Koning et al., 2013). Por esta razón, se planteó caracterizar la formación de O-IMVs en *Pseudomonas aeruginosa*, cultivada en presencia de antibióticos. Concretamente se emplearon dos antibióticos con mecanismos de acción diferentes, la colestina que es un lipopéptido que desestabiliza la envuelta bacteriana ejerciendo un efecto detergente en las membranas celulares y la cefalosporina ceftazidima, que actúa inhibiendo la síntesis de peptidoglicano. Se determinó el rendimiento en la vesiculación de ambos cultivos y no se observó un incremento significativo en la cantidad de MVs en los cultivos inducidos con antibióticos respecto al cultivo control.

Al medir un parámetro asociado al contenido citoplasmático, como el DNA, únicamente se detectó una mayor secreción de DNA en vesículas obtenidas tras la incubación con colestina, pudiendo indicar que a pesar de no incrementar el contenido total de MVs podría estar induciendo la producción de O-IMVs. Sin embargo, por Cryo-EM, no se observaron O-IMVs en la cepa tratada, mientras si se observaron O-IMVs entre las MVs de la cepa control. Además, las OMVs visualizadas de muestras con antibiótico presentaban las membranas alteradas. En base a los resultados obtenidos, fue imposible atribuir el incremento en el contenido del citoplasma cuantificado por la medida del DNA, a una mayor presencia de O-IMVs en los sobrenadantes de la cepa inducida con antibióticos.

Para poder caracterizar mejor las nuevas O-IMVs era preciso conseguir separarlas del total de vesículas. Para ello, se realizó un experimento de ultracentrifugación con gradiente de densidad. La presencia de componentes del citoplasma asociado a vesículas a lo largo del gradiente fue monitorizada mediante la presencia de un DNA plasmídico. Los resultados obtenidos mostraron presencia de DNA en todas las fracciones del gradiente en las que había MVs, por lo que no se consiguió obtener una fracción pura de O-IMVs. Una explicación sería que a pesar de que las O-IMVs son ligeramente más

grandes a las OMVs, sus rangos promedio se encuentran solapados y en consecuencia, ambas presentan unas densidades similares. Por otra parte, también sería posible que una pequeña porción de DNA se encuentre asociada a OMVs. Es evidente entonces, que sería interesante repetir el experimento de separación de MVs mediante gradientes, pero utilizando otro marcador de citoplasma, como ATP.

Como alternativa a los gradientes, en los últimos años se ha desarrollado la citometría de alta resolución para intentar separar las MVs. Además, esta técnica presenta la ventaja de que permite analizar y distinguir diferentes características de las partículas en suspensión, permitiendo clasificar los tipos de MVs por otros parámetros quizás más adecuados que la densidad. Sin embargo, esta técnica presenta ciertas limitaciones que discutiremos más adelante y no ha sido utilizada en nuestro estudio con la finalidad de separar las O-IMVs del conjunto de MVs (Nolte-’t Hoen et al., 2012).

En definitiva, las diferentes observaciones realizadas utilizando distintas técnicas de microscopia han permitido proponer la existencia de un nuevo tipo de vesículas de membrana en bacterias gramnegativas que se forman a través de la protuberancia conjunta de la OM e IM, englobando en su interior material procedente del citoplasma. Para designar este nuevo tipo de vesícula, propusimos el nombre de *outer-inner membrane vesicle* (O-IMV). Su existencia permite explicar la presencia, al menos en parte, de componentes del citoplasma como proteínas, DNA y ATP detectados en muestras de vesículas.

## 2. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE UN MUTANTE HIPERVESICULANTE Y SUS MVs.

El hecho de observar que cambios en las condiciones de cultivo de la bacteria promueven la secreción de vesículas y que éstas actúan en diferentes procesos biológicos, sugieren que la formación de MVs no sucedería aleatoriamente, sino que existiría un mecanismo molecular exquisitamente regulado, donde estarían implicados diversos elementos de la envuelta bacteriana. Inicialmente, los distintos mecanismos de formación o biogénesis de las MVs fueron propuestos a partir de la información extraída de los distintos estudios de los componentes de las MVs, sin llegar a discernir cuál era el mecanismo molecular responsable de la producción de MVs (Bonnington & Kuehn, 2014; Kulp et al., 2015; Orench-Rivera & Kuehn, 2016).

En los últimos años, para caracterizar los distintos elementos que participan en la vesiculación, se han realizado diversos estudios moleculares que concluyen que la mayoría de cepas con mutaciones en alguno de los componentes estructurales de la envuelta bacteriana presentan un incremento en la secreción de vesículas, detectado mediante el aumento en la concentración de LPS, proteína o lípidos de las muestras de MVs aisladas. Sin embargo, el aumento en estos componentes también podría generarse debido a una alteración de las envueltas bacterianas que incrementaría la presencia de fragmentos de las membranas celulares en los sobrenadantes. Para descartar esta posibilidad, normalmente, se realiza un ensayo de supervivencia de la cepa mutante frente a algún agente tóxico o bien, se compara el crecimiento de la cepa mutante respecto a la cepa salvaje, asumiendo que si no se observan diferencias significa que la estabilidad de la envuelta bacteriana no se encuentra comprometida por la mutación (Deatherage et al., 2009; McBroom et al., 2006; McBroom & Kuehn, 2007; Roier et al., 2016).

Para confirmar que el incremento en los valores de LPS o proteína son realmente debidos a un incremento del número de MVs en los sobrenadantes, las muestras suelen visualizarse mediante TEM de tinciones negativas. Habitualmente, se observan unas estructuras redondeadas formadas por una bicapa, que presentan un diámetro comprendido entre los 20-300 nm que son atribuidos a la presencia de MVs en los sobrenadantes (Elhenawy et al., 2016; Haurat et al., 2010; Song et al., 2008). De todos modos y según lo expuesto en la introducción, la tinción negativa carece de resolución para poder analizar con detalle la estructura vesicular, al no permitir distinguir entre diferentes tipos de vesículas o descartar la presencia de fragmentos de membrana recircularizados.

Un estudio realizado en MVs de *Pseudomonas putida* DOT-T1E aisladas de cultivos bacterianos sometidos a distintas situaciones de estrés, mostraban una composición proteica diferente y una mayor cantidad de proteína en comparación con las MVs control. Al visualizar las mismas MVs mediante Cryo-EM preparadas por PF, observaron que las MVs exhibían una estructura amorfa con diámetros muy irregulares y se observaba la presencia de fragmentos de membrana. Por lo tanto, el incremento en los valores de proteína o LPS procedía de estructuras vesiculares muy alteradas (Baumgarten et al., 2012).

Una vez demostrada la idoneidad de las técnicas utilizadas de microscopía electrónica para revelar detalles estructurales de vesículas, se procedió a analizar la estructura de la

cepa probiótica *Escherichia coli* Nissle (EcN) y un mutante que presentaba una alteración en un componente de la envuelta. La cepa mutante (EcN  $\Delta tolR$ ) presentaba una delección en el sistema *tol-pal*, que se trata de un complejo de varias proteínas estructurales que se expande a lo largo de la envuelta bacteriana e interacciona con la proteína OmpA (Schwechheimer & Kuehn, 2015). Varios estudios, describen que una mutación en alguno de los componentes de este sistema, como sería el caso de la proteína tolR, conduce a fenotipos hipervesiculantes, pero sin alterar la estabilidad de la membrana (Bernadac et al., 1998; Kulp et al., 2015; Turner et al., 2015).

Los estudios realizados en mutantes *tol-pal* descartan mediante el seguimiento del crecimiento bacteriano de la cepa salvaje y la cepa mutante, que el incremento en la vesiculación sea debido a una mayor lisis celular generada por una pérdida en la integridad de la membrana (Kulp et al., 2015). Los resultados obtenidos mostraron que la cepa EcN salvaje y la EcN  $\Delta tolR$  presentaban unas curvas de crecimiento muy similares y con el mismo número de células viables en el cultivo, determinando que no existían diferencias en el crecimiento de ambas cepas.

El análisis de los rendimientos vesiculares, mediante el cálculo del LPS y lípidos, determinó una mayor producción de MVs en la cepa mutante EcN  $\Delta tolR$  respecto la cepa EcN, confirmando el fenotipo hipervesiculante de la cepa mutante. En las tinciones negativas de las suspensiones de vesículas, se observó la presencia de MVs en ambas muestras. Sin embargo, las MVs de EcN  $\Delta tolR$  presentaron un tamaño más disperso que las MVs de la cepa salvaje, aunque no se detectaron fragmentos de membrana y tampoco se visualizaron diferencias estructurales entre las MVs de ambas cepas.

No obstante, el estudio comparativo mediante TEM de HPF-FS y Cryo-EM de EcN y EcN  $\Delta tolR$ , analizando tanto las células como las MVs secretadas, permitió visualizar la presencia en la cepa EcN  $\Delta tolR$ , de vesículas con morfologías muy dispares y que no se correspondían con la descripción de las OMVs clásicas o de las nuevas O-IMVs. Se observaron MVs que presentaban varias bicapas concéntricas, grupos de 2 o 3 vesículas rodeados por una membrana y también, fragmentos recircularizados de membrana. Mientras que para la cepa EcN cultivada en las mismas condiciones, sólo se observaron O-IMVs juntamente con OMVs. Además, de la influencia de la mutación en la morfología vesicular, estas observaciones también confirmaron que una cepa probiótica de *E.coli* producía el nuevo tipo de vesículas O-IMVs.

El ensayo de la internalización de las MVs procedentes de EcN y EcN  $\Delta tolR$ , mostró que partiendo de la misma la misma cantidad de vesículas, las MVs obtenidas de la cepa mutante EcN  $\Delta tolR$  presentaban un menor grado de internalización respecto a las MVs de la cepa EcN. Estos resultados concuerdan con los previamente descritos en las MVs procedentes de los mutantes  $\Delta tol$  y  $\Delta pal$  de *Helicobacter pylori* que mostraron algunas diferencias en el contenido de proteína, inmunogenicidad y propiedades pro-inflamatorias entre las MVs de cepas mutantes respecto a la salvaje (Turner et al., 2015).

La distinta internalización de las MVs detectada en este trabajo puede estar relacionada con los distintos tipos de estructuras vesiculares observados en el mutante  $\Delta tolR$ . Es probable, que la presencia de estas estructuras vesiculares sea originada por los esfuerzos de la bacteria mutante para devolver el equilibrio a la envuelta bacteriana, ya que las observaciones de TEM por HPF-FS de la cepa EcN  $\Delta tolR$  mostraron una estructura celular alterada. Por lo tanto, aunque la mutación no compromete la viabilidad de la célula, si que modifica la estructura celular y por lo tanto, podría causar la producción de unas estructuras similares a MVs, pero que serían artefactuales y en consecuencia no podrían ser internalizadas por la célula receptora.

Pronto se cumplirán 20 años de la publicación de los primeros estudios moleculares realizados con mutantes con el objetivo de averiguar el mecanismo de producción de MVs (Bernadac et al., 1998). Sin embargo, esta es la primera vez que se describen la presencia de estos artefactos vesiculares en cepas mutantes hiperpervesiculantes. Probablemente, la única razón por la cual no se hayan detectado antes, es porqué se continúan realizando estudios estructurales de microscopía electrónica a partir de muestras preparadas mediante fijaciones químicas y tinciones negativas. Así pues, es necesario un compromiso dentro de la comunidad científica para promover el uso de técnicas alternativas de microscópicas que permitan preservar la estructura natural de los organismos para la caracterización de nuevos mecanismos de vesiculación. A parte, es preciso el análisis de todas aquellas cepas supuestamente hiperproductoras de vesículas que han servido para proponer mecanismos de vesiculación, empleando Cryo-EM y TEM de HPF-FS.

En los últimos años, se han desarrollado un conjunto de nuevas técnicas de microscopía óptica que han conseguido superar el límite de difracción de la luz y han permitido obtener imágenes de sistemas biológicos vivos con una resolución cercana de 10 nm. Este conjunto de técnicas se agrupan bajo el nombre de microscopía de súper-resolución, ya

que consigue visualizar los especímenes biológicos con mayor detalle que un microscopio confocal estándar (Arroyo-Pieck & Peón, 2015).

Un estudio reciente propone un nuevo mecanismo de formación de MVs en *Pseudomonas aeruginosa* mediante el uso de microscopía de súper-resolución, que también conduciría a la encapsulación de contenido citoplasmático en el interior de las vesículas, a través de una lisis explosiva de la célula. Las visualizaciones mediante microscopía de súper-resolución muestran que la rotura celular derivada de la lisis celular explosiva, causaría una liberación del contenido citoplasmático que sería englobado en el interior de “vesículas” por recircularización de la membrana celular. Por lo tanto, incluiría durante su formación componentes presentes en el espacio extracelular, como DNA, proteínas del citoplasma y RNA (Turnbull et al., 2016). Sin embargo, esta técnica tampoco tiene la suficiente resolución para determinar el detalle de la estructura de las MVs generadas por la lisis explosiva. Así pues, faltaría el estudio mediante TEM de HPF-FS y Cryo-EM para confirmar que se trata de un nuevo mecanismo de vesiculación. Además, teniendo en cuenta que este tipo de mecanismo conduciría a la incorporación de material de forma aleatoria, no explicaría el distinto perfil proteico que muestran las MVs respecto a extractos celulares. Igualmente, este mecanismo de formación de MVs no excluiría que el material procedente del citoplasma también pueda ser incorporado mediante la secreción de O-IMVs.

### **3. SECRECIÓN DE RNA MEDIADA POR VESÍCULAS DE MEMBRANA (MVs).**

La descripción de las nuevas O-IMVs ha permitido explicar la presencia de material procedente del citoplasma en muestras de MVs. Este descubrimiento abre la puerta a estudiar qué otros componentes del citoplasma podrían ser secretados por la célula mediante MVs.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que el RNA además de ejercer su función estándar en la síntesis proteica, también realiza funciones reguladoras, promoviendo cambios en la expresión génica de la célula (Waters & Storz, 2009). En bacterias, los RNAs con funciones reguladoras se denominan generalmente *small RNAs* (sRNAs) y se ha propuesto que éstos ejercerían un control ágil de la fisiología bacteria, gracias a que son sintetizados rápidamente, no requieren ser traducidos a proteínas para ser funcionales, y actúan sobre dianas ya “pre-existentes” en el citoplasma, como proteínas reguladoras o

mRNAs. Por lo tanto, si esto lo unimos a que las MVs pueden actuar como vehículos para la transmisión de señales entre células, la inclusión de sRNAs y su transferencia mediante MVs, podría estar promoviendo procesos de comunicación intercelular.

Recientemente, han sido publicados algunos estudios referentes a la encapsulación de RNA en MVs de las bacterias gramnegativas *E. coli* y *Vibrio cholerae* (Ghosal et al., 2015; Sjöström et al., 2015). También se ha descrito que *P. aeruginosa* puede transferir mediante MVs un RNA específico que promueve la inmunosupresión en la célula huésped, incrementando las posibilidades de supervivencia de la bacteria (Koeppen et al., 2016). Una acción similar, se ha descrito en el nematodo patógeno *Heligmosomoides polygyrus*, cuyas EVs también inhiben la respuesta inmune del huésped mediante la transferencia de miRNAs (Buck et al., 2014). Estas evidencias sugerirían que este mecanismo de transferencia de RNA mediado por vesículas con el fin de regular la relación huésped-patógeno, podría ser una característica compartida tanto en organismos procariontes como eucariotes (Tsatsaronis et al., 2018).

No obstante, no se han realizado estudios en el contexto de una comunidad bacteriana y por tanto se desconoce si este tipo de regulación mediada por sRNAs en MVs podría también tener lugar en este entorno más complejo. En este sentido, se decidió trabajar con *P. aeruginosa*, una bacteria modelo para el estudio de la formación de biofilm y en la que se han descrito algunos sRNAs que regularían la formación de estas comunidades multicelulares, pero siempre ejerciendo una regulación a nivel intracelular (Kay et al., 2006; Pusic et al., 2016; Elisabeth Sonnleitner & Haas, 2011). Por lo tanto, si los sRNAs fueran incluidos en vesículas para ser transferidos a una célula receptora, produciendo un cambio en su expresión génica, se confirmaría que los sRNAs ejercen un papel regulador también dentro de la comunidad bacteriana.

En base a este razonamiento, se ha desarrollado una segunda parte de este trabajo de tesis doctoral, con el objetivo de establecer si sRNAs de *P. aeruginosa* podrían ser secretados mediante vesículas y podrían ser transferidos produciendo un cambio en la expresión de la célula receptora.

La realización del estudio centrado en la detección y caracterización del contenido de RNA en MVs de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 es bastante novedoso y ha supuesto la optimización de una metodología específica, que normalmente no es utilizada para trabajar con RNA celular. Por esta razón, debido al esfuerzo notable que se ha realizado,

se añade un apartado como Anexo para discutir y puntualizar aspectos sobre la metodología empleada para que se tengan en cuenta en futuros estudios relacionados con el tema y para la valoración de los resultados obtenidos (Anexo 1).

En primer lugar, se determinó que el RNA se encontraba principalmente interiorizado en MVs de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, concretamente el 65%, y éste no estaba unido a proteínas extracelulares, como sucede en eucariotas (Mateescu et al., 2017). También, se cuantificó el grado de encapsulación de tres sRNAs asociados a la formación de biofilm, estableciendo que éstos presentaban unos valores de internalización distintos. Para CrcZ y RsmZ se determinó que el 60% estaba interiorizado en MVs frente el 25% de PhrS. Este resultado es interesante ya que el hecho de observar una mayor proporción de CrcZ y RsmZ en comparación con PhrS podría indicar la existencia de un mecanismo de enriquecimiento específico de sRNAs en el interior de las MVs. Por otra parte, subraya la importancia de realizar los estudios sobre la encapsulación de RNA con vesículas tratadas previamente con RNAsa (ver Anexo 1).

Se ha sugerido que las EVs aisladas de organismos eucariotas empaquetan específicamente RNAs de pequeño tamaño, sugiriendo la existencia de un mecanismo concreto para la secreción activa de RNA mediado por vesículas. Esta observación fue realizada por primera vez por Valadi y colaboradores (2007) en exosomas aislados de células de mamífero, observando un patrón de RNA completamente distinto entre las EVs y las células productoras. En el estudio que se presenta, la comparación de los perfiles electroforéticos de muestras de RNA de MVs y de células, mostró que las MVs presentaban una mayor proporción de RNAs de pequeño tamaño, situados en la zona de 40 – 80 nt. Descartando la presencia de RNAs de tamaño inferior a 20 nt, que corresponderían a la fracción de miRNAs y que han sido detectados asociados a MVs en otros estudios (Ghosal et al., 2015; Koeppen et al., 2016).

Por el contrario, el RNA más abundantes en la célula fue el ribosomal, mientras que las en MVs estaba presente, pero en una proporción mucho menor que en la célula. Al mismo tiempo, el análisis del perfil de RNA celular permitió confirmar la ausencia de RNAsas en las muestras al obtener un valor del RIN > 9,5 y por lo tanto, descartando que la presencia de RNA de pequeño tamaño en MVs fuera originada por una degradación del RNA.



Al observar un patrón distinto de RNA entre MVs y células, se procedió a realizar una secuenciación masiva del contenido de sRNA (RNA-seq) para determinar la naturaleza del RNA encapsulado y profundizar en las posibles diferencias existentes entre la bacteria y sus MVs. A diferencia de otros estudios publicados, el análisis de las librerías preparadas a partir de RNA vesicular, detectó un elevado número de secuencias obteniendo en cada una de las réplicas más de un 1 millón de secuencias, de las cuales el 90% mapearon contra el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* (Koeppen et al., 2016; Resch et al., 2016).

El estudio transcriptómico rebeló que las MVs encapsulaban mayoritariamente tRNAs (55%), seguidos por elementos codificantes para proteínas (13%) (CDS) y por último sRNA (5%). En cambio, para la célula los biotipos mayoritarios correspondieron a 36% de CDS, 12% de tRNAs y por último sRNA (5%). Por lo tanto, ambas muestras presentaban un patrón de RNA completamente distinto de modo que las especies más abundantes en MVs no lo eran en la célula.

En el estudio transcriptómico, a pesar de haber empleado una estrategia para enriquecer en RNA de pequeño tamaño, se han identificado una baja proporción de sRNAs. Como hemos comentado anteriormente, a pesar de que *P. aeruginosa* es una bacteria modelo para el estudio y caracterización de nuevos sRNAs reguladores, una elevada proporción de su genoma continúa sin estar caracterizado funcionalmente (Kung, et al., 2010). Además, hay que tener en cuenta que una característica intrínseca de los sRNAs es que presentan una baja homología a nivel de secuencia y por lo tanto, la secuencia por sí misma no tiene suficiente poder de predicción para distinguir entre las diferentes clases funcionales de sRNAs. Todo ello, dificulta enormemente la descripción de nuevos sRNAs a partir de estudios transcriptómicos (Susan Gottesman & Storz, 2011; Smirnov et al., 2016).

En base a estas consideraciones, es probable que un elevado número de secuencias que se alinean con regiones codificantes para proteínas y aquellas que corresponden a proteínas hipotéticas, puedan corresponder a sRNAs aún no caracterizados. Por esta razón, actualmente se están analizando los datos obtenidos en la transcriptómica para comparar las diferencias existentes entre MVs y la célula a nivel de secuencia, lo cual puede suministrar datos interesantes. Concretamente, se está realizando un análisis del “*covarage*” y posteriormente se buscarán posibles estructuras secundarias en los candidatos identificados.

Para la comparación de las secuencias obtenidas en busca de diferencias en la expresión es preciso realizar la normalización de las librerías. Este análisis permitió identificar alrededor de 300 transcritos que presentaban una expresión diferencial mayor de  $\log_2FC > 1,5$ , y entre ellos se encontró el sRNA CrcZ. Por otra parte, se identificaron 68 transcritos que presentaron un  $\log_2FC$  mayor a 4, por lo que estaban 16 veces más expresados en MVs que en la célula. Entre ellos, se detectaron la presencia de los dos sRNAs con funciones redundantes: RsmZ y RsmY. No obstante, lo que llamó más la atención fue que los RNAs más diferencialmente expresados correspondieron a tRNAs, concretamente tRNA<sup>Asp</sup> y tRNA<sup>Met</sup>.

El descubrimiento de tRNAs en vesículas no es nuevo ya que diversos estudios han descrito la presencia de tRNAs en muestras de vesículas tanto de eucariotas como de procariontes (Tsatsaronis et al., 2018). Incluso, se ha descrito que *P. aeruginosa* vehiculiza mediante MVs, un sRNA derivado de un tRNA responsable de realizar una inmunosupresión en la célula huésped (Koeppen et al., 2016). Recientemente, se ha observado que fragmentos pequeños provenientes del proceso de maduración de tRNAs, ejercerían funciones reguladoras y se ha propuesto que actuarían como esponjas inhibiendo la expresión de ciertos mRNAs mediante una unión directa, promoviendo el silenciamiento de genes de una forma similar a la realizada por los miRNAs. La generación de dichos fragmentos iría ligada a situaciones estresantes para la bacteria (Lalaouna et al., 2015).

Hasta el momento, se han descrito dos clases mayoritarias de tRNAs reguladores. Una corresponde a los tRNA “halves” que presentan un rango de tamaño comprendido entre 30-35 nt y que proceden del corte del tRNA por la mitad, generando dos fragmentos de tamaños similares. El otro tipo se denomina “tRNA-derived fragment” (tRFs) y consiste en fragmentos pequeños derivados del procesamiento del tRNA con un tamaño cercano a los 20 nt. En nuestro estudio los resultados obtenidos en el Bionalyzer permitirían confirmar que las MVs de *P. aeruginosa* no contendrían tRFs, ya que no se detectaron fragmentos de RNA de un tamaño cercano a 20 nt. Sin embargo, para poder confirmar que las MVs encapsulan tRNAs que han sido procesados sería preciso realizar Northern Blots de RNA procedente de muestras de MVs y compararlos con los presentes en el RNA celular. De todos modos, la baja concentración de RNA en vesículas es un impedimento técnico para la realización de dicha técnica (Beckmann et al., 2010; Pall & Hamilton, 2008).

Es importante tener en cuenta que estas diferencias detectadas en la expresión de ciertos RNAs podría estar producido por un sesgo generado durante la obtención del RNA. La extracción del RNA vesicular se realiza a partir de un pellet de MVs obtenidas de un volumen grande de cultivo (500 mL), mientras que la muestra de RNA celular se obtiene a partir de una pequeña alícuota de cultivo (700  $\mu$ L), por lo que el “enriquecimiento” de RNAs podría estar generado por el hecho de aislar el RNA vesicular de un concentrado de vesículas. Se podría intentar utilizar los mismos volúmenes iniciales, aunque seguramente no se obtendría una cantidad de RNA vesicular suficiente para realizar la librería.

El estudio realizado sobreexpresando CrcZ en la célula y posteriormente aislando sus vesículas, mostró que a pesar del aumento de los niveles intracelulares de CrcZ, no se correspondía con un incremento de CrcZ en muestras MVs. Este hecho indicaría, que la incorporación de sRNAs no sucede de forma pasiva, al menos, para CrcZ. Por otra parte, los estudios de estabilidad del RNA contenido en las MVs, mostraron que los niveles de CrcZ se mantenían estables al menos por 24 horas, cuándo está comúnmente aceptado que los sRNAs a nivel intracelular muestran semividas bastante cortas, comprendidas entre los 2 minutos hasta un máximo de 1 hora (Vogel et al., 2003).

Por lo tanto, es destacable que los resultados obtenidos en este trabajo, muestren una elevada estabilidad de los sRNAs en MVs, un contenido distinto de sRNAs y una menor proporción de RNA ribosomal en muestras de MVs en comparación con la célula. Estas observaciones, inducen a pensar que podría existir un mecanismo molecular que mediara una secreción activa de RNA en MVs.

En eucariotas, se ha descrito la existencia de una proteína cuya función principal sería la de incorporar específicamente ciertos miRNAs en exosomas (Villarroya-Beltri et al., 2013). También se han detectado en EVs de células de mamíferos, el empaquetamiento de la proteína DICER, encargada de mediar la unión del miRNA a su mRNA promoviendo su degradación, de forma muy similar a la función que realiza Hfq en bacterias. (Melo et al., 2014).

Tal como hemos comentado en la Introducción, la chaperona Hfq es una de las proteínas principales implicadas en la regulación post-transcripcional en una gran variedad de bacterias y se encarga de promover la interacción antisentido entre el sRNAs con su mRNA diana (Susan Gottesman & Storz, 2011). Por este motivo, se analizó la posibilidad

de que la proteína Hfq estuviera presente en muestras de MVs de *P. aeruginosa* PAO1. Los resultados mostraron que Hfq no era secretada en MVs o al menos, no en unos niveles detectables mediante western blot. En el estudio proteómico de MVs procedentes de *P. aeruginosa* realizado por Choi y colaboradores (2011) tampoco detectaron su presencia, sugiriendo que la incorporación de sRNAs en MVs sería independiente de la proteína de unión al RNA Hfq. Estos últimos resultados son destacables, ya que anteriormente se había descrito la encapsulación de pequeños RNA en vesículas, pero nunca se habían realizado experimentos para determinar cómo se pueden incorporar a las mismas MVs.

En definitiva, todos los resultados obtenidos hasta el momento indican que el RNA es exportado en vesículas, aunque se desconoce qué utilidad puede tener para la bacteria dentro del contexto de una comunidad bacteriana. *P. aeruginosa* es la bacteria modelo para el estudio de la percepción de cuórum o *Quorum Sensing* (QS) bacteriano, que entre otros procesos regula la transición entre la fase de vida libre de la bacteria y la formación del biofilm. El mecanismo de QS está regulado por señales que se caracterizan por ser señales difusibles al medio extracelular y que pueden ser interceptadas por otra célula, induciendo un cambio en su expresión genética (Jimenez et al., 2012). En estudios de transcriptómica de *P. aeruginosa* se ha demostrado que las bacterias que se encuentran en fase exponencial presentan un patrón de expresión génica similar al expresado durante el estado de vida libre, mientras que la bacteria en la fase estacionaria presenta un patrón similar al expresado durante la fase de biofilm. Además, se ha observado que los sRNAs CrcZ y RsmZ se encuentran sobreexpresados en el biofilm y en fase estacionaria, mientras que la expresión de PhrS es menor (Dötsch et al., 2012).

En base a este razonamiento, si determinados sRNAs pudieran ser secretados en MVs y captados por una célula receptora, estos podrían ser incluidos como un nuevo tipo de señal dentro del sistema QS. Por éste motivo, se caracterizó el contenido de sRNAs en MVs respecto al celular a lo largo de una curva de crecimiento de *P. aeruginosa* para intentar establecer una conexión entre el contenido de sRNAs en MV y el estado fisiológico en que se encuentra la bacteria.

En primer lugar, se caracterizó la producción de MVs a lo largo de una curva de crecimiento de *P. aeruginosa*. Generalmente, la cuantificación de MVs se realiza mediante el cálculo de proteína, LPS o lípidos de los pellets de vesículas aisladas de los sobrenadantes de cultivo. Por lo tanto, es preciso aislar las MVs, siendo éste un proceso

largo y que consume mucho tiempo ( Kulp et al., 2015; Roier et al., 2016; Tashiro et al., 2010).

Teniendo en consideración que probablemente la vesiculación se trate de un proceso altamente dinámico y estrechamente ligado al estado fisiológico de la bacteria, su estudio requiere del uso de técnicas alternativas que permitan un seguimiento frecuente y a tiempo real de la vesiculación (Kormelink et al., 2016). En los últimos años se ha desarrollado la citometría de flujo alta resolución (*High-sensitive Flow Cytometry*) que permite cuantificar directamente las MVs a partir de sobrenadantes de cultivo mediante el uso de fluorescencia (Wieser et al., 2014).

La citometría convencional no permite discriminar partículas que son menores que la longitud de onda de la luz, haciendo imposible la detección de MVs por su tamaño. Como alternativa, se ha propuesto la tinción de las MVs con marcadores fluorescentes, permitiendo establecer la fluorescencia como discriminante, detectando todas aquellas partículas que emitan fluorescencia por encima de un determinado umbral. Por lo tanto, para detectar las MVs en suspensión éstas deben ser marcadas con fluoróforos extremadamente brillantes y que no presenten fenómenos de autofluorescencia, cuando el agente de tinción no se encuentre unido a vesículas. Estas dos características las cumple el marcador FM4-64, que actúa intercalándose en la membrana lipídica de las MVs (Wieser et al., 2014).

Paralelamente, es importante realizar la calibración del instrumento que se vaya a utilizar para la cuantificación de vesículas, ya que no existe ningún citómetro especialmente diseñado para la detección de partículas con un diámetro inferior a 300 nm. Así pues, antes de realizar cualquier determinación es preciso ajustar ciertos parámetros como la intensidad de excitación del láser, el ruido del instrumento o la velocidad de flujo (Van der Vlist, et al., 2012; Wieser et al., 2014).

Con este fin, se evaluaron una serie de diluciones de MVs aisladas para determinar si el método empleado era suficientemente sensible para numerarlas y detectar el distinto aporte de MVs en cada dilución. Los resultados obtenidos mostraron que el número de vesículas detectado por citometría era proporcional a los valores de proteína y de LPS de las suspensiones de MVs y no era debida a procesos de autofluorescencia de las MVs, o a la presencia del agente de tinción en las suspensiones.

Al realizar el seguimiento de la vesiculación a lo largo de la curva de crecimiento, se observó que el número de MVs estaba estrechamente ligado al crecimiento bacteriano, ya que el incremento de la población bacteriana comportaba un incremento en la cantidad de MVs. Sin embargo, a partir de un determinado punto el incremento fue exponencial, coincidiendo con la secreción de piocianina al medio. Al normalizar el número de MVs por el número de células viables se observó que la tasa de vesiculación no se mantenía constante a lo largo de la curva de crecimiento, detectando un incremento en la vesiculación entre la transición de la fase exponencial a la estacionaria (1,6 – 1,9 – 2,1), para después disminuir drásticamente su concentración (2,3). Unos resultados parecidos fueron observados en el estudio realizado por Tashiro y colaboradores (2010) en MVs de *P. aeruginosa*, utilizando métodos tradicionales para la cuantificación de MVs.

Sin embargo la valoración del contenido de RNA en vesículas por distintos métodos (Quibit™, Bioanalyzer, RT-qPCR, RNA-seq), rebeló que la máxima cantidad de RNA asociado a MVs se producía en plena fase exponencial tardía (1,6), mientras que la cantidad de RNA disminuía con el tiempo, hasta el punto 2,3, que corresponde al punto en que la bacteria ha alcanzado la fase estacionaria y en el que prácticamente no se detectó RNA. El estudio transcriptómico mostró un contenido diferente de RNA entre las muestras obtenidas al final de la fase exponencial y principio estacionaria, que encapsulaban mayormente tRNAs, respecto a las MVs obtenidas en fase estacionaria (2,1 – 2,3), que mayormente contenían secuencias que codificaban para proteínas.

Después de la normalización de los datos obtenidos de las librerías, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de RNA entre los puntos 1,6 – 2,1. Por el contrario, el punto de la curva con una DO de 2,3 era completamente diferente a los puntos anteriores, con una menor proporción de RNA y una elevada variabilidad del RNA internalizado, haciendo imposible su comparación estadística. Mediante RT-PCR de MVs obtenidas en los distintos puntos, se observaron unos resultados similares, detectando un descenso estadísticamente significativo en el punto 2,3. Paralelamente, no se detectaron cambios en la expresión de sRNAs a nivel intracelular en ninguno de los puntos. Estos resultados indicarían que el contenido de RNA en MVs del punto 2,3 vendría dado por una razón biológica distinta.

El hecho de no haber detectado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de RNAs en el interior de las MVs a lo largo del tiempo y que la cantidad mayor de RNA esté asociada al punto de la fase exponencial (1,6), sugiere que las MVs que contienen

RNAs se producen en un punto específico del crecimiento bacteriano. Por lo tanto, la encapsulación de RNA no se daría por un proceso pasivo, ya que si fuera este el caso, la cantidad de RNA cuantificada habría de haber sido la misma en todos los puntos analizados. Los resultados observados inducen a pensar que se producen diversos tipos de MVs con distinto contenido en función de la fase de crecimiento.

Aunque no permita sacar conclusiones, un resultado a destacar en relación a lo expuesto anteriormente, es que durante las visualizaciones mediante Cryo-EM de las suspensiones de MVs obtenidas en los distintos puntos, sólo se detectaron O-IMVs en los puntos 1,6 y 1,9. Se trata justamente de los puntos en que se observa una mayor cantidad de RNA, indicando que quizás la producción de O-IMVs podría estar relacionada con la secreción de RNA. Sin embargo, sería necesario realizar más experimentos para poder confirmar esta relación.

Un resultado interesante obtenido, es la observación de que la secreción de RNA en vesículas se produce justo antes de detectar la presencia del pigmento piocianina en los sobrenadantes de cultivo. Se ha descrito que *P. aeruginosa* justo en el momento en que empieza a transitar hacia la fase estacionaria y por lo tanto, a adaptar toda su fisiología para formar un biofilm, secreta al medio piocianina. Este pigmento también participa como molécula señalizadora dentro del sistema de QS y es concretamente una de las últimas señales a ser sintetizadas tras la activación del sistema QS. Por último, recordar que este sistema es activado al alcanzar una determinada densidad celular (Dietrich, et al., 2006; Papenfort & Bassler, 2016).

El hecho de haber observado en los experimentos una relación entre la densidad celular, la activación del QS y el incremento de la secreción de RNA mediada por MVs, para posteriormente desaparecer, apuntaría a la idea de que las MVs estarían de algún modo facilitando procesos de señalización que tendrían lugar entre la fase exponencial y la fase estacionaria, y por lo tanto, participarían en la transición entre el estado planctónico y de biofilm en *P. aeruginosa*.

Los resultados obtenidos permiten teorizar sobre cómo tendría lugar la regulación mediada por sRNAs secretados por MVs. Como se ha comentado, el RNA ejerce una regulación rápida sobre mensajes “preexistentes”, por lo tanto las MVs con RNA serían secretadas justo en el momento que se activa el QS promoviendo el inicio de la transición a la fase estacionaria, realizando supuestamente un ajuste rápido de la fisiología

bacteriana. Simultáneamente, empezaría la síntesis de las señales autoinductoras como AHL, PQS y piocianina, que tienen una acción más sostenida en el tiempo, pero su producción requiere de la síntesis de *nov*o de los enzimas de la ruta. También, a medida que la bacteria se adentra en la fase estacionaria, empieza a secretar otro tipo de MVs que no contiene RNA. Una vez que las células alcanzan completamente la fase estacionaria, las MVs con RNA ya habrían sido captadas por las bacterias del medio. Este suceso de reabsorción de las MVs en el punto 2,3 podría explicar el descenso en la cantidad de RNA y la marcada aleatoriedad detectada en los datos obtenidos en la RNA-seq de este punto.

Por último, se estudió la habilidad de las MVs para mediar la transferencia de sRNAs y determinar si los sRNAs incorporados a MVs eran funcionales. En estos ensayos se evaluó la transferencia tanto de RsmZ/Y como de CrcZ, aunque en ninguno de los ensayos realizados se detectaron cambios en la fluorescencia de la cepa reportera, no pudiendo confirmar la transferencia de sRNAs por MVs en *P. aeruginosa* PAO1.

Se ha sugerido que los sRNAs bacterianos serían responsables de realizar un ajuste delicado de la expresión génica, ya que los fenotipos desarrollados por los mutantes delecionados para algún sRNA no presentan un fenotipo evidente en comparación con la cepa salvaje, o bien, el cambio detectado en la expresión es muy ligero (Babski et al., 2014). Por otra parte, es importante recordar que los sRNAs actuarían de forma estequiométrica con su diana, ya sea mRNA o proteína, por lo tanto, se requeriría de la presencia de una gran concentración de sRNAs para detectar algún cambio en la fluorescencia. Además, el tipo de regulación que ejercen no es un tipo de señal activa que se amplifique con el tiempo, como serían las señales autoinductoras que participan del QS. Por todas estas razones, es probable que aunque se diera una transferencia de sRNAs mediada por MVs, el número de copias internalizadas no sería suficientes para generar un incremento significativo en la fluorescencia (Waters & Storz, 2009).

Por otra parte, en *Pseudomonas aeruginosa* nunca se ha conseguido demostrar la transferencia de ácidos nucleicos mediada por MVs dentro de la misma cepa. Renelli y colaboradores (2004) evaluaron en esta bacteria, la capacidad de las MVs para transferir un plásmido que codificaba para una resistencia a antibiótico, y no hallaron las condiciones para que sucediera la internalización de las MVs por la célula receptora. En cambio, sí se ha descrito la adquisición por parte de *P. aeruginosa* de plásmidos incorporados en MVs procedentes de otras cepas, como *Aeromonas veronii*, *Enterobacter cloacae* y *E. coli* (Tran & Boedicker, 2017). La falta de un protocolo común para el



estudio de la transferencia mediada por vesículas, el desconocimiento de qué factores promueven la captación de MVs y el mecanismo que media la incorporación de los componentes internalizados en las MVs por la célula receptora, dificultan el establecimiento de aquellas condiciones que permitan la transferencia de RNA por MVs y en consecuencia, dificultan su estudio (Hasegawa et al., 2015) .

Por lo tanto, al no haber podido demostrar la transferencia de RNA mediante MVs, no se puede confirmar que éstas participen en procesos de comunicación bacteriana a través de la vehiculización de sRNAs. Demostrar la funcionalidad del RNA incluido en vesículas sería fundamental para poder atribuir un significado biológico a la incorporación del RNA en vesículas.

## **VI. CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES

1. Las técnicas de Cryo-EM y TEM de HPF-FS han demostrado ser esenciales para la caracterización estructural de vesículas de membrana permitiendo observar la presencia de distintos tipos vesiculares.
2. El estudio estructural de TEM de muestras preparadas mediante HPF-FS y Cryo-EM ha permitido demostrar la existencia de un nuevo tipo de vesícula de membrana externa en bacterias gramnegativas que deriva no sólo de la membrana externa bacteriana, sino que también incorpora membrana interna y contenido citoplasmático durante su formación. Proponemos que este nuevo tipo de vesícula sea denominado vesícula de membrana externa e interna (*Outer-inner membrane vesicle*, O-IMV).
3. Las observaciones por TEM de HPF y Cryo-TEM de la cepa ambiental *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> y de las tres cepas patógenas *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Acinetobacter baumannii* AB41 y sus vesículas, han permitido confirmar que la secreción de las O-IMVs sucede en cepas cultivadas en condiciones óptimas de crecimiento tanto en medios sólidos como líquidos, descartando que su origen sea debido a la lisis celular.
4. Mediante Cryo-EM se ha establecido que las nuevas O-IMVs son secretadas en medios líquidos en una menor proporción respecto las OMVs convencionales, con una frecuencia aproximada de 1 de cada 1000 para las cepas *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup>, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Acinetobacter baumannii* AB41.
5. Mediante el inmunomarcaje sobre cortes ultrafinos de MVs aisladas de *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> y *Neisseria gonorrhoeae*, empleando un anticuerpo específico contra DNA, se ha demostrado la encapsulación de DNA en las O-IMVs confirmando que las nuevas O-IMVs pueden incorporar material del citoplasma.
6. El análisis mediante Cryo-EM y TEM de HPF-FS de un mutante de *Escherichia coli* Nissle delecionado para la proteína de la envuelta tolR, ha permitido observar la presencia de artefactos vesiculares ocasionados por la mutación, descartando que el incremento detectado en los niveles de proteína, LPS o lípidos sea producido por un incremento en el número de vesículas funcionales secretadas.

7. Las MVs de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 contienen RNA y el ensayo de *RNAse protection assay*, ha demostrado que el RNA se encuentra mayoritariamente en el interior de las vesículas y protegido de la acción de enzimas degradativos externos. El RNA contenido en vesículas es estable y su inclusión en MVs no depende de la chaperona Hfq.
8. El análisis de los perfiles electroforéticos del RNA vesicular de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 junto con la RNA-seq de sRNAs, han confirmado la distinta naturaleza del RNA encapsulado en MVs respecto al celular, detectando que las MVs presentan mayor abundancia de transcritos con un tamaño comprendido entre los 40 y 80 nucleótidos, correspondiendo mayoritariamente a tRNAs. Los sRNAs RsmZ, CrcZ y PhrS vinculados a la formación de biofilm también son interiorizados en MVs.
9. El seguimiento del número de MVs en una curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, mediante citometría de alta resolución, ha permitido confirmar que la concentración de MVs en los sobrenadantes no es constante durante el tiempo, detectando un incremento en la vesiculación durante la transición de la fase exponencial a la estacionaria, para después disminuir drásticamente su concentración en la fase estacionaria.
10. La valoración del contenido de RNA en vesículas de *P. aeruginosa* PAO1 por distintos métodos (Quibit™, Bioanalyzer, RT-qPCR, RNA-seq) ha demostrado que la cantidad máxima de RNA asociado a MVs se obtiene en la fase exponencial tardía, mientras que la cantidad de RNA disminuye con el tiempo. Confirmando que la secreción de RNA es dependiente de la fase de crecimiento.
11. El análisis de los datos obtenidos en la RNA-seq no ha detectado diferencias en el contenido de RNA internalizado en vesículas de *P. aeruginosa* PAO1 extraídas en distintas etapas de la curva de crecimiento.
12. La sobreexpresión del sRNA CrcZ de *P. aeruginosa* PAO1 en la célula no comporta una mayor incorporación del sRNA en MVs confirmando que la incorporación de RNA es independiente de los niveles intracelulares.

## **VII.BIBLIOGRAFÍA**



- Aguilera, L., Toloza, L., Giménez, R., Odena, A., Oliveira, E., Aguilar, J., Baldomà, L. (2013). Proteomic analysis of outer membrane vesicles from the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917. *Proteomics*, *14*(2–3), 222–9.
- Arroyo-Pieck, A., & Peón, J. (2015). Premio Nobel de Química 2014 Microscopía de fluorescencia con super-resolución. *Educación Química*, *26*(1), 50–51.
- Babski, J., Maier, L.-K., Heyer, R., Jaschinski, K., Prasse, D., Jäger, D., Soppa, J. (2014). Small regulatory RNAs in Archaea. *RNA Biology*, *11*(5), 484–493.
- Balleza, E., López-Bojorquez, L. N., Martínez-Antonio, A., Resendis-Antonio, O., Lozada-Chávez, I., Balderas-Martínez, Y. I., Collado-Vides, J. (2009). Regulation by transcription factors in bacteria: Beyond description. *FEMS Microbiology Reviews*, *33*(1), 133–151.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116* (2): 181–197.
- Baumgarten, T., Sperling, S., Seifert, J., von Bergen, M., Steiniger, F., Wick, L. Y., & Heipieper, H. J. (2012). Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(17), 6217–6224.
- Beckmann, B. M., Grünweller, A., Weber, M. H. W., & Hartmann, R. K. (2010). Northern blot detection of endogenous small RNAs (~14 nt) in bacterial total RNA extracts. *Nucleic Acids Research*, *38*(14).
- Berleman, J., & Auer, M. (2013). The role of bacterial outer membrane vesicles for intra- and interspecies delivery. *Environmental Microbiology*, *15*(2), 347–354.
- Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J., Raina, S., Llobès, R., & Inge, L. (1998). *Escherichia coli tol-pal* mutants form Outer Membrane Vesicles. *Journal of Bacteriology*, *180*(18), 4872–4878.
- Beveridge, T. J. (1999). Minireview structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal Of Bacteriology*, *181*(16), 4725–4733.
- Bhaya, D., Davison, M., & Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual Review*



- of Genetics*, 45(1), 273–297.
- Billler, S. J., Schubotz, F., Roggensack, S. E., Thompson, A. W., Summons, R. E., & Chisholm, S. W. (2014). Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science*, 343(6167), 183–186.
- Bitto, N. J., Chapman, R., Pidot, S., Costin, A., Lo, C., Choi, J., Ferrero, R. L. (2017). Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Scientific Reports*, 7(1), 7072.
- Blenkiron, C., Simonov, D., Muthukaruppan, A., Tsai, P., Dauros, P., Green, S., Phillips, A. R. (2016). Uropathogenic *Escherichia coli* releases extracellular vesicles that are associated with RNA. *Plos One*, 11(8).
- Bomberger, J. M., Maceachran, D. P., Coutermarsh, B. A., Ye, S., O 'Toole, G. A., & Stanton, B. A. (2009). Long-distance delivery of bacterial virulence factors by pseudomonas aeruginosa outer membrane vesicles. *PLoS Pathog*, 5(4): e1000382.
- Bonnington, K. E., & Kuehn, M. J. (2014). Protein selection and export via outer membrane vesicles ☆. *BBA - Molecular Cell Research*, 1843, 1612–1619.
- Bozal, N., Montes, M. J., Miñana-Galbis, D., Manresa, A., & Mercadé, E. (2009). *Shewanella vesiculosa* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from an Antarctic coastal area. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(2), 336–340
- Breaker, R. R. (2012). Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(2):a003566.
- Buck, A. H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H. J., Quintana, J. F., Le Bihan, T., Maizels, R. M. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature*, 5:5488
- Camilli, A., & Bassler, B. L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311(5764), 1113–1116.
- Cañas, M.-A., Giménez, R., Fábrega, M.-J., Toloza, L., Baldomà, L., & Badia, J.(2016). Outer Membrane Vesicles from the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and the Commensal ECOR12 Enter Intestinal Epithelial Cells via Clathrin-Dependent Endocytosis and Elicit Differential Effects on DNA Damage. *Plos One*, 11(8),

e0160374.

- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, *18*(10), 997–1006.
- Cheng, Y., Grigorieff, N., Penczek, P. A., & Walz, T. (2015). A primer to single-particle cryo-electron microscopy. *Cell*, *161*(3), 439–449.
- Choi, D.-S., Kim, D.-K., Choi, S. J., Lee, J., Choi, J.-P., Rho, S., Gho, Y. S. (2011a). Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics*, *11*(16), 3424–3429.
- Choi, J. W., Kim, S. C., Hong, S. H., & Lee, H. J. (2017). Secretable small RNAs via outer membrane vesicles in periodontal pathogens. *Journal of Dental Research*, *96*(4), 458–466.
- Chua, S. L., Liu, Y., Yam, J. K. H., Chen, Y., Vejborg, R. M., Tan, B. G. C., Yang, L. (2014). Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nature Communications*, *5*, 4462.
- Coggan, K. A., & Wolfgang, M. C. (2012). Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Current Issues in Molecular Biology*, *14*(2), 47–70.
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *30*, 255–289.
- Deatherage, B. L., & Cookson, B. T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infection and Immunity*, *80*(6), 1948–1957.
- Deatherage, B. L., Lara, J. C., Bergsbaken, T., Rassouljian Barrett, S. L., Lara, S., & Cookson, B. T. (2009). Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Molecular Microbiology*, *72*(6), 1395–407.
- Delgado, L., Martínez, G., López-Iglesias, C., & Mercadé, E. (2015). Cryo-electron tomography of plunge-frozen whole bacteria and vitreous sections to analyze the recently described bacterial cytoplasmic structure, the Stack. *Journal of Structural*

- Biology*, 189(3), 220–229.
- Dietrich, L. E. P., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., & Newman, D. K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 61(5), 1308–1321.
- Dobro, M. J., Oikonomou, C. M., Piper, A., Cohen, J., Guo, K., Tadayon, J., Jensen, G. J. (2017). Uncharacterized bacterial structures revealed by electron cryotomography. *Journal of Bacteriology*: e00100–17
- Dohnalkova, A. C., Marshall, M. J., Arey, B. W., Williams, K. H., Buck, E. C., & Fredrickson, J. K. (2011). Imaging hydrated microbial extracellular polymers: Comparative analysis by electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1254–1262.
- Domingues, S., & Nielsen, K. M. (2017). Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 38:16–21.
- 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.
- Dorward, D. W., Garon, C. F., & Judd, R. C. (1989a). Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*, 171(5), 2499–505.
- Dötsch, A., Eckweiler, D., Schniederjans, M., Zimmermann, A., Jensen, V., Scharfe, M., Häussler, S. (2012). The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing. *Plos One*, 7(2), e31092.
- Dubochet, J. (2007). The physics of rapid cooling and its implications for cryoimmobilization of cells. *Methods in Cell Biology*, 2007(79), 7–21.
- Dubochet, J. (2012). Cryo-EM-the first thirty years. *Journal of Microscopy*, 245(3), 221–224.
- Eldh, M., Lötval, J., Malmhäll, C., & Ekström, K. (2012). Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods. *Molecular Immunology*, 50(4), 278–286.

- Elhenawy, W., Bording-Jorgensen, M., Valguarnera, E., Haurat, M. F., Wine, E., & Feldman, M. F. (2016). LPS remodeling triggers formation of outer membrane vesicles in salmonella. *MBio*, 7(4), 1–12.
- Elhenawy, W., Debelyy, M. O., & Feldman, M. F. (2014). Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into *Bacteroides* outer membrane vesicles. *MBio*, 5(2):e00909-14.
- Ellis, T. N., & Kuehn, M. J. (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(1), 81–94.
- Eltsov, M., & Zuber, B. (2006). Transmission electron microscopy of the bacterial nucleoid. *Journal of Structural Biology*, 156(2), 246–254.
- Ercoli, G., Tani, C., Pezzicoli, A., Vacca, I., Martinelli, M., Pecetta, S., ... Aricò, B. (2015). Lytm proteins play a crucial role in cell separation, outer membrane composition, and pathogenesis in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *MBio*, 6(2), 1–10.
- Essar, D. W., & Eberly, L. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 884–900.
- Farley M. M, Bo Hu , Margolin W., Liu J. (2016). Minicells, Back in Fashion. *Journal of Bacteriology*, 198(8): 1186–1195.
- Faruq, O., & Vecchione, A. (2015). microRNA: Diagnostic Perspective. *Frontiers in Medicine*, 2, 51.
- Ferrara, S., Carloni, S., Fulco, R., Falcone, M., Macchi, R., & Bertoni, G. (2015). Post-transcriptional regulation of the virulence-associated enzyme AlgC by the  $\sigma(22)$  -dependent small RNA ErsA of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 17(1), 199–214.
- Florez, C., Raab, J. E., Cooke, A. C., & Schertzer, J. W. (2017). Membrane distribution of the pseudomonas quinolone signal modulates outer membrane vesicle production in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, 8(4), e01034-17.

- Frias, A., Manresa, A., de Oliveira, E., López-Iglesias, C., & Mercade, E. (2010). Membrane vesicles: A common feature in the extracellular matter of cold-adapted antarctic bacteria. *Microbial Ecology*, *59*(3), 476–486.
- 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.
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, *67*(3), 159–173.
- Ghosal, A., Upadhyaya, B. B., Fritz, J. V., Heintz-Buschart, A., Desai, M. S., Yusuf, D., Wilmes, P. (2015). The extracellular RNA complement of *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*, *4*(2), 252–266.
- Gomelsky, M. (2011). cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: Bacteria use them all! *Molecular Microbiology*, *79*(3), 562–565.
- Gómez-Lozano, M., Marvig, R. L., Molin, S., & Long, K. S. (2012). Genome-wide identification of novel small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, *14*(8), 2006–2016.
- Gómez-Lozano, M., Marvig, R. L., Tulstrup, M. V. L., & Molin, S. (2014). Expression of antisense small RNAs in response to stress in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics*, *15*(1), 783.
- Gottesman, S. (2005). Micros for microbes: Non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends in Genetics*, *21*(7), 399–404.
- Gottesman, S., McCullen, C. a., & Guillier, M. (2006). Small RNA Regulators and the bacterial response to stress small rna regulators and the bacterial response to stress. *Context*, *LXXI*, 1–11.
- Gottesman, S., & Storz, G. (2011). Bacterial small RNA regulators: Versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(12), a003798
- Graves, P., & Zeng, Y. (2012). Biogenesis of mammalian micrnas: A Global View. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, *10*(5), 239–245.

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108.
- Han, K., Tjaden, B., & Lory, S. (2016). GRIL-seq provides a method for identifying direct targets of bacterial small regulatory RNA by in vivo proximity ligation. *Nature Microbiology*, 2, 16239.
- Haneklaus, M., Gerlic, M., Kurowska-Stolarska, M., Rainey, A.-A., Pich, D., McInnes, I. B., Masters, S. L. (2012). Cutting Edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1 Production. *The Journal of Immunology*, 189 (8), 3795–3799.
- Harrigan W.F. & McCance M.E. (1966). Laboratory methods in microbiology. London. UK. *Academic Press*.
- Hasegawa, Y., Futamata, H., & Tashiro, Y. (2015). Complexities of cell-to-cell communication through membrane vesicles: implications for selective interaction of membrane vesicles with microbial cells. *Frontiers in Microbiology*, 6, 633.
- Haurat, M. F., Aduse-Opoku, J., Rangarajan, M., Dorobantu, L., Gray, M. R., Curtis, M. A., & Feldman, M. F. (2010). Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*. 286 (2): 1269–1276.
- Henderson, B., & Martin, A. (2011). Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infection and Immunity*, 79(9), 3476–3491.
- Hironaka, I., Iwase, T., Sugimoto, S., Okuda, K., Tajima, A., Yanaga, K., & Mizunoe, Y. (2013). Glucose triggers ATP secretion from bacteria in a growth-phase-dependent manner. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(7), 2328–2335.
- Hoën, E. N. M. N. t., van der Vlist, E. J., Aalberts, M., Mertens, H. C. H., Bosch, B. J., Bartelink, W., Wauben, M. H. M. (2012). Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(5), 712–720.
- Horstman, A. L., & Kuehn, M. J. (2000). Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *The Journal of Biological*

- Chemistry*, 275(17), 12489–96.
- Hunter, R. C., & Beveridge, T. J. (2005). High-resolution visualization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms by freeze-substitution transmission electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, 187(22), 7619–7630.
- Hurbain, I., & Sachse, M. (2011). The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells. *Biology of the Cell*, 103(9), 405–20.
- Irie, Y., Jensen, P. Ø., Diggle, S. P., Allen, R. J., Gordon, V., & Bjarnsholt, T. (2016). Predictive computer models for biofilm detachment properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, 7(3), 10–12.
- Ismail, N., Wang, Y., Dakhllallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Marsh, C. B. (2013). Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*, 121(6), 984–995.
- Jan, A. T. (2017). Outer Membrane Vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: A perspective update. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–11.
- Jun, S. H., Lee, J. H., Kim, B. R., Kim, S. Il, Park, T. I., Lee, J. C., & Lee, Y. C. (2013). *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. *Plos One*, 8(8), e71751.
- Jung, A. L., Stoiber, C., Herkt, C. E., Schulz, C., Bertrams, W., & Schmeck, B. (2016). *Legionella pneumophila*-derived outer membrane vesicles promote bacterial replication in macrophages. *PLoS Pathog*, 12(4), e1005592
- 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.
- Kahn, M. E., Barany, F., & Smith, H. O. (1983). Transformasomes: specialized membranous structures that protect DNA during *Haemophilus* transformation. *PNAS*, 80, 6927–6931.
- Kaparakis-Liaskos, M., & Ferrero, R. L. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology*, 15(6), 375–387.

- Kato, S., Kowashi, Y., & Demuth, D. R. (2002). Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microbial Pathogenesis*, 32(1), 1–13.
- Kay, E., Humair, B., Dénervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Haas, D. (2006). Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188(16), 6026–6033.
- Klimentová, J., & Stulík, J. (2015). Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiological Research*, 170, 1–9.
- Koepfen, K., Hampton, T. H., Jarek, M., Scharfe, M., Gerber, S. A., Mielcarz, D. W., Stanton, B. A. (2016). A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles. *PLoS Pathogens*, 12(6), e1005672.
- Kolling, G. L., & Matthews, K. R. (1999). Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 1843–1848.
- Komeili, A., Li, Z., Newman, D. K., & Jensen, G. J. (2006). Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the Actin-Like Protein MamK. *Science*, 311, 1550–1554.
- Kormelink, T. G., Arkesteijn, G. J. A., Nauwelaers, F. A., van den Engh, G., Nolte-t Hoen, E. N. M., & Wauben, M. H. M. (2016). Prerequisites for the analysis and sorting of extracellular vesicle subpopulations by high-resolution flow cytometry. *Cytometry Part A*, 89(2), 135–147.
- Kosaka, N. (2016). Decoding the Secret of Cancer by Means of Extracellular Vesicles. *Journal of Clinical Medicine*, 5(2), 22.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Steven Hill, D., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1), 175–176.
- Kuehn, M. J., & Kesty, N. C. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes & Development*, 19 (22), 2645–2655.



- Kulkarni, H. M., & Jagannadham, M. V. (2014). Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology*, *160*, 2109–2121.
- Kulp, A. J., Sun, B., Ai, T., Manning, A. J., Orench-Rivera, N., Schmid, A. K., & Kuehn, M. J. (2015). Genome-wide assessment of outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *PloS One*, *10* (9), e0139200.
- Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual Review of Microbiology*, *64*, 163–84.
- Kunert, A., Losse, J., Gruszyn, C., Hühn, M., Kaendler, K., Mikkat, S., Zipfel, P. F. (2007). Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *179*(5), 2979–2988.
- Kung, V. L., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2010). The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(4), 621–641.
- Kwon, S.-O., Gho, Y. S., Lee, J. C., & Kim, S. Il. (2009). Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiology Letters*, *297*(2), 150–156.
- Lalaouna, D., Carrier, M. C., & Massé, E. (2015). Every little piece counts: the many faces of tRNA transcripts. *Transcription*, *6*(4), 74–77.
- 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.
- Lee, C.-H., & Tsai, C.-M. (1999). Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the Purpald Assay: measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation. *Analytical Biochemistry*, *267*(1), 161–168.
- Lee, E.-Y., Bang, J. Y., Park, G. W., Choi, D.-S., Kang, J. S., Kim, H.-J., Gho, Y. S. (2007). Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics*, *7*(17), 3143–3153.

- Lee, E.-Y., Choi, D.-S., Kim, K.-P., & Ghoo, Y. S. (2008). Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrometry Reviews*, 27(6), 535–555.
- Lee, J., Kim, O. Y., & Ghoo, Y. S. (2016). Proteomic profiling of Gram-negative bacterial outer membrane vesicles: Current perspectives. *Proteomics - Clinical Applications*, 10(9–10), 897–909.
- Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., Zhang, L. H. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature Chemical Biology*, 9(5), 339–343.
- Lee, J., & Zhang, L. (2014). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein and Cell*, 6(1), 26–41.
- Lee, T., & Feig, A. L. (2008). The RNA binding protein Hfq interacts specifically with tRNAs. *RNA*, 14(3), 514–523.
- Legewie, S., Dienst, D., Wilde, A., Herzog, H., & Axmann, I. M. (2008). Small RNAs establish delays and temporal thresholds in gene expression. *Biophysical Journal*, 95(7), 3232–3238.
- Levine, E., Zhang, Z., Kuhlman, T., & Hwa, T. (2007). Quantitative characteristics of gene regulation by small RNA. *PLoS Biology*, 5(9), 1998–2010.
- Li, J., Azam, F., & Zhang, S. (2016). Outer membrane vesicles containing signalling molecules and active hydrolytic enzymes released by a coral pathogen *Vibrio shilonii* AK1. *Environmental Microbiology*, 18(11), 3850–3866.
- Li, Z., Clarke, A. J., & Beveridge, T. J. (1998). Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *Journal of Bacteriology*, 180(20), 5478–5483.
- Lin, J., Zhang, W., Cheng, J., Yang, X., Zhu, K., Wang, Y., Shen, X. (2017). A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nature Communications*, 8, 14888.
- Livny, J., & Waldor, M. K. (2007). Identification of small RNAs in diverse bacterial species. *Current Opinion in Microbiology*, 10(2), 96–101.
- Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Vizio, D. Di, Gardiner, C., Thery, C.

- (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1),26913
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15, 550
- MacDonald, I. A., & Kuehn, M. J. (2012). Offense and defense: Microbial membrane vesicles play both ways. *Research in Microbiology*, 163(9–10), 607–618.
- MacDonald, I. A., & Kuehna, M. J. (2013). Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 195(13), 2971–2981.
- Mashburn-Warren, L. M., & Whiteley, M. (2006). Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 61(4), 839–46.
- Mashburn-Warren, L., Mclean, R. J. C., & Whiteley, M. (2008). Gram-negative outer membrane vesicles: Beyond the cell surface. *Geobiology*, 6(3), 214–219.
- Mashburn, L. M., & Whiteley, M. (2005). Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, 437(7057), 422–425.
- Massé, E., & Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *PNAS*, 99(7), 4620–4625.
- Mateescu, B., K Kowal, E. J., M van Balkom, B. W., Bartel, S., Bhattacharyya, S. N., Buzás, E. I., M Nolte-, E. N. (2017). Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA – A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1), 1286095.
- McBroom, A. J., Johnson, A. P., Vemulapalli, S., & Kuehn, M. J. (2006). Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *Journal of Bacteriology*, 188(15), 5385–92.
- 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, 545–558.
- Mehta, P., Goyal, S., & Wingreen, N. S. (2008). A quantitative comparison of sRNA-

- based and protein-based gene regulation. *Molecular Systems Biology*, 4, 221.
- Melo, S. A., Sugimoto, H., O'Connell, J. T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Kalluri, R. (2014). Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell*, 26(5), 707–721.
- Mempin, R., Tran, H., Chen, C., Gong, H., Kim Ho, K., & Lu, S. (2013). Release of extracellular ATP by bacteria during growth. *BMC Microbiology*, 13, 301.
- Miller, C. L., Romero, M., Karna, S. L. R., Chen, T., Heeb, S., & Leung, K. P. (2016). RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions. *BMC Microbiology*, 16(1), 155
- Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M. Á., Sánchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature Communications*, 2(1),1285.
- Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2012). Intercellular communication: Diverse structures for exchange of genetic information. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(5), 328–335.
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 39.
- Mullaney, E., Brown, P. A., Smith, S. M., Botting, C. H., Yamaoka, Y. Y., Terres, A. M., Windle, H. J. (2009). Proteomic and functional characterization of the outer membrane vesicles from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics. Clinical Applications*, 3(7), 785–96.
- Murphy, K., Park, A. J., Hao, Y., Brewer, D., Lam, J. S., & Khursigaraa, C. M. (2014). Influence of O polysaccharides on biofilm development and outer membrane vesicle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 196(7), 1306–1317.
- Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The Multiple Signaling Systems regulating virulence in *Pseudomonas*

- aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 46–65.
- Nakao, R., Hasegawa, H., Ochiai, K., Takashiba, S., Ainai, A., Ohnishi, M., Senpuku, H. (2011). Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* Elicit a Mucosal immune response. *Plos One*, 6(10), e0026163
- Narayanan, A., Iordanskiy, S., Das, R., Van Duyne, R., Santos, S., Jaworski, E., Kashanchi, F. (2013). Exosomes derived from HIV-1-infected cells contain trans-activation response element RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 288(27), 20014–20033.
- Nevot, M., Deroncelle, V., López-Iglesias, C., Bozal, N., Guinea, J., & Mercade, E. (2006b). Ultrastructural analysis of the extracellular matter secreted by the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF3. *Microbial Ecology*, 51(4), 501–507.
- Nevot, M., Deroncelé, V., Messner, P., Guinea, J., & Mercadé, E. (2006). Characterization of outer membrane vesicles released by the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF3. *Environmental Microbiology*, 8(9), 1523–1533.
- Oikonomou, C. M., Chang, Y.-W., & Jensen, G. J. (2016). A new view into prokaryotic cell biology from electron cryotomography. *Nature Reviews Microbiology* 4, 205 – 220.
- Orench-Rivera, N., & Kuehn, M. J. (2016). Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. *Cellular Microbiology*, 18(11), 1525–1536.
- Pall, G. S., & Hamilton, A. J. (2008). Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nature Protocols*, 3(6), 1077–1084.
- Palsdottir, H., Remis, J. P., Schaudinn, C., O’Toole, E., Lux, R., Shi, W., Auer, M. (2009). Three-dimensional macromolecular organization of cryofixed *Myxococcus xanthus* biofilms as revealed by electron microscopic tomography. *Journal of Bacteriology*, 191(7), 2077–2082.
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576–588.
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T. G., Cámara, M., & Haas,

- D. (2001). The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-Acylhomoserine Lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(22), 6676–6683.
- Pierson, T., Matrakas, D., Taylor, Y. U., Manyam, G., Morozov, V. N., Zhou, W., & van Hoek, M. L. (2011). Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *Journal of Proteome Research*, 10(3), 954–67.
- Pilhofer, M., Ladinsky, M. S., McDowall, A. W., & Jensen, G. J. (2010). Bacterial TEM. New insights from Cryo-microscopy. *Methods in Cell Biology* 96, 21–45.
- Pusic, P., Tata, M., Wolfinger, M. T., Sonnleitner, E., Häussler, S., & Bläsi, U. (2016). Cross-regulation by CrcZ RNA controls anoxic biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 6(1), 39621. <https://doi.org/10.1038/srep39621>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383.
- Renelli, M., Matias, V., Lo, R. Y., & Beveridge, T. J. (2004). DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, 150(7), 2161–2169.
- Repoila, F., & Darfeuille, F. (2009). Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biology of the Cell*, 101(2), 117–131.
- Resch, U., Tsatsaronis, J. A., Le Rhun, A., Stübiger, G., Rohde, M., Kasvandik, S., ... Charpentier, E. (2016). A Two-Component Regulatory System Impacts Extracellular Membrane-Derived Vesicle Production in Group A *Streptococcus*. *MBio*, 7(6), e00207-16.
- Richards, G. R., & Vanderpool, C. K. (2011). Molecular call and response: The physiology of bacterial small RNAs. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(10), 525–531.
- Roier, S., Blume, T., Klug, L., Wagner, G. E., Elhenawy, W., Zangger, K., ... Schild, S. (2015). A basis for vaccine development: Comparative characterization of *Haemophilus influenzae* outer membrane vesicles. *International Journal of Medical Microbiology*, 305, 298–309.

- Roier, S., Zingl, F. G., Cakar, F., Durakovic, S., Kohl, P., Eichmann, T. O., Schild, S. (2016). A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nature Communications*, 7, 10515.
- Roman, T., Koning, 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.
- Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J. A., Soares, N. C., 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), 3084–90.
- Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3), 203–221.
- Sabra, W., Lü, H., Zeng Correspondence, A.-P., & Zeng, A.-P. (2003). Alterations in the formation of lipopolysaccharide and membrane vesicles on the surface of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under oxygen stress conditions. *Microbiology*, 149, 2789–2795.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *CSH Protocols*, 2006(4), pii: pdb.prot4540.
- Santangelo, L., Giurato, G., Cicchini, C., Alonzi, T., Weisz, A., & Correspondence, M. T. (2016). The RNA-Binding Protein SYNCRIP is a component of the hepatocyte exosomal machinery controlling microrna sorting. *Cell Reports*, 17(3):799-808.
- Schooling, S. R., & Beveridge, T. J. (2006). Membrane vesicles: An overlooked component of the matrices of biofilms. *Journal of Bacteriology*, 188(16), 5945–5957.
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 605–619.
- Frias A. (2012). THESIS Caracterización estructural de bacterias antárticas adaptadas al

- frío y detección de nuevos emulsionantes : estudio de la cepa *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup>.
- Sharpe, S. W., Kuehn, M. J., & Mason, K. M. (2011). Elicitation of epithelial cell-derived immune effectors by outer membrane vesicles of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity*, 79(11), 4361–4369.
- Shimoni, Y., Friedlander, G., Hetzroni, G., Niv, G., Altuvia, S., Biham, O., & Margalit, H. (2007). Regulation of gene expression by small non-coding RNAs: A quantitative view. *Molecular Systems Biology*, 3, 138. 1
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5), a000414.
- Sjöström, A. E., Sandblad, L., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2015a). Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. *Scientific Reports*, 5(1), 15329.
- Smirnov, A., Förstner, K. U., Holmqvist, E., Otto, A., Günster, R., Becher, D., Vogel, J. (2016). Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(41), 11591–11596.
- Song, T., Mika, F., Lindmark, B., Liu, Z., Schild, S., Bishop, A., Wai, S. N. (2008). A new *Vibrio cholerae* sRNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Molecular Microbiology*, 70(1), 100–111.
- Sonnleitner, E., Abdou, L., & Haas, D. (2009). Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), 21866–21871.
- Sonnleitner, E., & Bläsi, U. (2014). Regulation of Hfq by the RNA CrcZ in *Pseudomonas aeruginosa* Carbon Catabolite Repression. *PLoS Genetics*, 10(6), e1004440.
- Sonnleitner, E., Gonzalez, N., Sorger-Domenigg, T., Heeb, S., Richter, A. S., Backofen, R., Bläsi, U. (2011). The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal. *Molecular Microbiology*, 80(4), 868–885.
- Sonnleitner, E., & Haas, D. (2011). Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(1), 63–79.



- Sonnleitner, E., Hagens, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., Habel, A., Jäger, K. E., & Bläsi, U. (2003). Reduced virulence of a Hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microbial Pathogenesis*, 35(5), 217–228.
- Sonnleitner, E., Prindl, K., & Bläsi, U. (2017). The *Pseudomonas aeruginosa* CrcZ RNA interferes with Hfq-mediated riboregulation. *Plos One*, 12(7), e0180887.
- Sonnleitner, E., Sorger-Domenigg, T., Madej, M. J., Findeiss, S., Hackermuller, J., Huttenhofer, A., Moll, I. (2008). Detection of small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by RNomics and structure-based bioinformatic tools. *Microbiology*, 154(10), 3175–3187.
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199–210.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 187–209.
- Subramanian, P., Pirbadian, S., El-Naggar, M. Y., & Jensen, G. J. (2018). Ultrastructure of *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires revealed by electron cryotomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201718810.
- Tashiro, Y., Ichikawa, S., Shimizu, M., Toyofuku, M., Takaya, N., Nakajima-Kambe, T., Nomura, N. (2010). Variation of physiochemical properties and cell association activity of membrane vesicles with growth phase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), 3732–3739.
- Tashiro, Y., Inagaki, A., Shimizu, M., Ichikawa, S., Takaya, N., Nakajima-Kambe, T., Nomura, N. (2011). Characterization of Phospholipids in Membrane Vesicles Derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(3), 605–607.
- Tata, M., Amman, F., Pawar, V., Wolfinger, M. T., Weiss, S., Häussler, S., & Bläsi, U. (2017). The Anaerobically Induced sRNA PaiI Affects Denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2312.
- Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We

- Are and Where We Need to Go. *Cell*, 164(6), 1226–1232.
- Toyofuku, M., Morinaga, K., Hashimoto, Y., Uhl, J., Shimamura, H., Inaba, H., Nomura, N. (2017). Membrane vesicle-mediated bacterial communication. *ISME Journal*, 11(6), 1504–1509. ht
- Toyofuku, M., Roschitzki, B., Riedel, K., & Eberl, L. (2012). Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *Journal of Proteome Research*, 11, 4906–4915.
- Tran, F., & Boedicker, J. Q. (2017). Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer. *Scientific Reports*, 7(1), 8813.
- Tsatsaronis, J. A., Franch-Arroyo, S., Resch, U., & Charpentier, E. (2018). Extracellular vesicle RNA: A universal mediator of microbial communication? *Trends in Microbiology*, 26(5), 401–410.
- Turnbull, L., Toyofuku, M., Hynen, A. L., Kurosawa, M., Pessi, G., Petty, N. K., Whitchurch, C. B. (2016). Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nature Communications*, 7, 11220
- Turner, L., Praszkie, J., Hutton, M. L., Steer, D., Ramm, G., Kaparakis-Liaskos, M., & Ferrero, R. L. (2015). Increased outer membrane vesicle formation in a *Helicobacter pylori* tolB Mutant. *Helicobacter*, 20(4), 269–283.
- Unal, C. M., Schaar, V., & Riesbeck, K. (2011). Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine. *Seminars in Immunopathology*, 33(5), 395–408.
- Urban, J. H., & Vogel, J. (2007). Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs in vivo. *Nucleic Acids Research*, 35(3), 1018–1037.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659.
- Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D. A., & Filloux, A. (2018). Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Opinion in Microbiology*, 41, 15–20.
- Van Assche, E., Van Puyvelde, S., Vanderleyden, J., & Steenackers, H. P. (2015). RNA-

- binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6, 00141.
- van der Vlist, E. J., Nolte-’t Hoen, E. N. M., Stoorvogel, W., Arkesteijn, G. J. A., & Wauben, M. H. M. (2012). Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry. *Nature Protocols*, 7(7), 1311–1326.
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F., & Mittelbrunn, M. (2014). Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Seminars in Cancer Biology*, 28, 3–13.
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications*, 4(1), 2980.
- Vogel, J., Bartels, V., Tang, T. H., Churakov, G., Slagter-Jäger, J. G., Hüttenhofer, A., & Wagner, E. G. H. (2003). RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic Acids Research*, 31(22), 6435–6443.
- Wai, S. N., Lindmark, B., Söderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J., Uhlin, B. E. (2003). Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*, 115(1), 25–35.
- Waters, L. S., & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell*, 136(4), 615–628.
- Wenner, N., Maes, A., Cotado-Sampayo, M., & Lapouge, K. (2014). NrsZ: A novel, processed, nitrogen-dependent, small non-coding RNA that regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence. *Environmental Microbiology*, 16(4), 1053–1068.
- Wieser, A., Storz, E., Liegl, G., Peter, A., Pritsch, M., Shock, J., Schubert, S. (2014). Efficient quantification and characterization of bacterial outer membrane derived nano-particles with flow cytometric analysis. *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 1032–1037.
- Wilderman, P. J., Sowa, N. A., FitzGerald, D. J., FitzGerald, P. C., Gottesman, S., Ochsner, U. A., & Vasil, M. L. (2004). Identification of tandem duplicate regulatory

- small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *PNAS*, *101*(26), 9792–9797.
- Xi, C., & Wu, J. (2010). dATP/ATP, a multifunctional nucleotide, stimulates bacterial cell lysis, extracellular DNA release and biofilm development. *PLoS One*, *5*(10), e13355.
- Yáñez-Mó, M., R-M Siljander, P., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borrà, F. E., Buzas, E. I., & De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Citation: Journal of Extracellular Vesicles*, *14*, 27066.
- 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.
- Yonezawa, H., Osaki, T., Woo, T., Kurata, S., Zaman, C., Hojo, F., Kamiya, S. (2011). Analysis of outer membrane vesicle protein involved in biofilm formation of *Helicobacter pylori*. *Anaerobe*, *17*(6), 388–390.
- Yoon, Y. J., Kim, O. Y., & Gho, Y. S. (2014). Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. *BMB Reports*, *47*(10), 531–539.
- Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Brinkman, F. S. L. (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* *26*(13), 1608–1615.
- Yu, Y., Wang, X., & Fan, G. (2017). Versatile effects of bacterium-released membrane vesicles on mammalian cells and infectious/inflammatory diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, *39*(4), 514–533.
- Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Zhang, C. Y. (2010). Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Molecular Cell*, *39*(1), 133–144.
- Zhou, L., Srisatjaluk, R., Justus, D. ., & Doyle, R. . (1998). On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, *163*(2), 223–228.
- Zhou, W., Fong, M. Y., Min, Y., Somlo, G., Liu, L., Palomares, M. R., Wang, S. E. (2014). Cancer-Secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote

metastasis. *Cancer Cell*, 25(4), 501–515.

## **VIII. ANEXOS**



## VIII. ANEXOS

### **ANEXO 1. DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA PARA LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE RNA EN VESÍCULAS.**

El trabajar con MVs siempre representa un cierto desafío técnico, a causa de los bajos rendimientos en la obtención de MVs a partir de los sobrenadantes y al pequeño tamaño de las mismas. Además, se añade el hecho de que las vesículas contienen una mínima cantidad de RNA. Por estos motivos, se han publicado varias revisiones con el fin de estandarizar los métodos para el estudio de MVs y RNA, ya que en general no se pueden utilizar las mismas técnicas que para estudiar el RNA celular (Lötvall et al., 2014; Mateescu et al., 2017).

En primer lugar, es esencial establecer unas condiciones de trabajo que eviten la presencia del enzima RNAsa y obtener resultados reproducibles. Por ello, se habilitó una zona especial para el tratamiento de las muestras, que además disponía de una cabina de flujo laminar de uso exclusivo. El uso de cabinas, es importante para evitar la contaminación microbiológica de los reactivos del kit de extracción y de las aguas empleadas, que supondrían un aporte de RNAsas, comprometiendo la integridad del RNA.

La composición de las membranas vesiculares difiere de la composición de las membranas de célula bacteriana, por lo que se recomienda optimizar el kit empleado para la extracción del RNA vesicular antes de realizar los estudios funcionales (Zhang et al., 2010). Por esta razón, se evaluó el RNA obtenido procedente de diluciones seriadas de una misma muestra de MVs y se relacionó con el contenido de proteína o LPS de la muestra. Los resultados obtenidos permitieron establecer un rango en el cual el aporte de MVs fue proporcional la cantidad de RNA obtenida. Además, mediante el análisis de los perfiles electroforéticos de RNA vesicular y celular, se comprobó que el kit conseguía retener tanto la fracción de RNA de tamaño inferior a 200 nt, como el RNA total.

Otro punto crítico a la hora de valorar la concentración de RNA en vesículas, es el método de cuantificación empleado. Generalmente, las cuantificaciones de ácidos nucleicos en la mayoría de laboratorios se realizan mediante el uso del espectrofotómetro Nanodrop®. Éste método de determinación es fácil, rápido y permite realizar una estimación de la pureza de la muestra. Sin embargo, sólo determina la concentración de aquellas soluciones que presentan unas concentraciones  $>10$  ng/ $\mu$ L y por lo tanto, carece de la sensibilidad necesaria para realizar una estimación del RNA en vesículas. Así pues, se



recomienda el empleo de métodos fluorimétricos para la cuantificación del RNA en muestras de MVs. Uno de los métodos más utilizado es el Qubit RNA-HS, con una sensibilidad  $>1$  ng/ $\mu$ L (Mateescu et al., 2017).

Una alternativa a la cuantificación por métodos fluorimétricos, es la RT-qPCR. Ésta presenta una mayor sensibilidad, aunque sólo permite cuantificar la concentración de un sRNA concreto. Sin embargo, el mayor problema al utilizar esta técnica es que no se dispone de información de genes cuya expresión sea constante en vesículas, por lo que es preciso normalizar por algún parámetro. En el presente estudio, se decidió realizar cuantificaciones absolutas mediante RT-qPCR de los sRNAs de interés y normalizar por el aporte de MVs calculado por el valor de LPS. Otra alternativa que se ha empleado es normalizar los valores de expresión de un sRNA concreto por el número de copias presentes en el citoplasma de la bacteria (Ghosal et al., 2015). Sin embargo, tal como hemos podido observar en el experimento de inducción de la expresión de CrcZ, no siempre el nivel de expresión de un sRNA a nivel intracelular comporta un grado de internalización proporcional en MVs.

Para la caracterización del tamaño de RNAs presentes en MVs se requiere el análisis de los perfiles electroforéticos. Para ello, se utilizó el Bioanalyzer con el chip de análisis de Agilent RNA 6000 Pico, ya que presenta una sensibilidad de 0,05-5 ng/ $\mu$ L. No obstante, en un estudio realizado en MVs de *P. aeruginosa* se valoraron los perfiles mediante geles de agarosa teñidos con SybrSafe®. Este método no permite caracterizar el RNA que presenta un tamaño de fragmentos  $< 200$  nt. Además, tampoco presenta el rango de sensibilidad necesario ya que sólo permite visualizar aquellos fragmentos que presentan de 0,5 hasta 5 ng por banda. Así pues, el estudio concluyó que el RNA encapsulado presentaba unos tamaños comprendidos entre los 15 y 50 nt y estaba desprovisto de RNA ribosomal, cuando en nuestras muestras el tamaño comprendido fue de 40 a 80 nt y se detectó la presencia de RNA ribosomal, aunque en menor medida que el RNA de pequeño tamaño.

Asimismo, también se realizó la optimización del tratamiento externo con el enzima RNAsa. Por lo general los estudios realizados con MVs de bacterias no realizan un tratamiento enzimático de las MVs para eliminar el RNA que pudiera encontrarse en su exterior. Este punto es crítico para confirmar que realmente el RNA se encuentra interiorizado, y aún más cuándo en el presente estudio se determinó que sólo el 65% del RNA cuantificado se encontraba en el interior de MVs. Probablemente la falta de un

tratamiento externo con RNAsa sea la causa de ciertas incoherencias publicadas en los artículos de RNA en vesículas. Concretamente, en el estudio publicado por Ghosal y colaboradores (2015) describieron que el 90% de las secuencias detectadas en MVs correspondían a RNA procedente de componentes del medio de cultivo. Por otra parte, en el estudio publicado por Turnbull y colaboradores (2016) donde se describe la encapsulación de contenido del citoplasma mediante la formación de MVs por el mecanismo de lisis explosiva, muestran un perfil de RNA vesicular similar al RNA celular. Sin embargo, cabe sospechar que la mayoría de RNA vesicular detectado realmente procedería de la lisis celular y no estaría asociado a un proceso de secreción mediado por vesículas. Es decir, que la correlación que obtienen en la expresión de RNA vesicular con el RNA celular, es probable que se deba una contaminación de RNA liberado durante la lisis. Por último, un estudio realizado en MVs de una *E. coli* uropatogénica, mostró que la cantidad de RNA ribosomal asociado a vesículas variaba entre el 70% y el 99% (Blenkiron et al., 2016). Sin embargo, en nuestras muestras de transcriptómica se observaron unos porcentajes similares entre réplicas. Por lo tanto, todas estas evidencias sugieren que el hecho de evitar el tratamiento de RNAsa conllevaría a la presencia de RNA extracelular que estaría contaminando las muestras de MVs, conduciendo a conclusiones erróneas.

Así pues, es necesario el establecimiento de una metodología común de trabajo para el estudio de RNA aislado de vesículas de membrana bacteriana y al mismo tiempo, desarrollar una tecnología que posibilite la caracterización del RNA con una mayor sensibilidad que la actual, para poder continuar avanzando en nuestro conocimiento sobre MVs y RNA.



**ANEXO 2. TABLA CON LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN LA PROTEÓMICA DE *N. gonorrhoeae*.**

**Tabla A1.** Proteínas identificadas de *N. gonorrhoeae* MVs con al menos 2 péptidos de alta confianza. Peso molecular (MW), aminoácidos (AA), Cluster of orthologous groups (COG), Coverage (Cov.).

Membrana externa (OM), Membrana interna (IM), Periplasma (P), Citoplasma (C), Extracelular (E), Desconocida (U)

Accession number	Protein name	Score	Cov.	# AAs	MW [kDa]	Subcellular location	COG general categories	COG functional description
D0V9T9	Porin IA protein (Fragment)	2089,11	77,06	327	35,7	OM	Metabolism	Transport
D6IJS5	Putative uncharacterized protein	1562,55	70,56	445	49,9	OM	Cellular processes and signaling	Cell wall/membrane biogenesis
A5HM77	Porin (Fragment)	899,11	45,49	266	29,2	OM	Metabolism	Transport metabolism
D1E547	OM protein assembly factor BamA	769,33	70,58	792	88,0	OM	Poorly characterized	Poorly characterized
P07050	OM protein P.III	540,09	69,92	236	25,5	OM	Poorly characterized	Poorly characterized
Q5FAD2	Type IV pilus biogenesis and competence protein PilQ	366,65	69,16	723	77,9	OM	Cellular processes and signaling	Protein secretion
Q04876	Opacity protein opA53 (Fragment)	361,89	29,71	239	26,7	OM	Poorly characterized	Poorly characterized
Q01996	Transferrin-binding protein I	350,81	49,95	915	102,2	OM	Metabolism	Transport
D1E4D4	Transferrin-binding protein I	346,48	48,74	915	101,8	OM	Metabolism	Transport metabolism
C6ZG61	NspA (Fragment)	335,11	60,92	174	18,3	OM	Poorly characterized	Poorly characterized
Q50985	OM protein assembly factor BamD	303,44	71,91	267	30,8	OM	Information storage and processing	Poorly characterized
E8SLZ8	LPS-assembly protein LptD	257,67	42,86	791	86,4	OM	Metabolism	Cell wall/membrane biogenesis
E8SMZ8	Putative uncharacterized protein	246,52	54,26	376	38,9	OM	Cellular processes and signaling	Cell wall/membrane biogenesis
D1D324	Putative uncharacterized protein	226,07	39,46	598	65,9	OM	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DBA8	Lactoferrin receptor	207,76	45,39	943	105,6	OM	Metabolism	Transport
Q50943	Opa15063G	180,54	26,15	283	31,9	OM	Poorly characterized	Poorly characterized
D1E5T8	Opacity protein (Fragment)	167,11	45,26	190	21,2	OM	Poorly characterized	Poorly characterized
Q5FAF4	OM opacity protein B	164,07	27,17	265	29,6	OM	Poorly characterized	Poorly characterized

D1D8R3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	99,88	47,06	272	28,9	OM	Cellular signaling	Cellular processes and signaling	Protein turnover/Chaperones
D1DZ06	Putative uncharacterized protein	99,51	44,88	615	67,7	OM	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DKF2	OM protein assembly factor BamE	92,92	64,00	125	13,9	OM	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1E4R8	Opa protein (Fragment)	88,53	31,35	185	20,6	OM	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DA25	Multidrug efflux pump channel protein	54,26	32,33	467	50,4	OM	Metabolism	Metabolism	Transport metabolism
D1DIL2	H.8 OM protein	48,64	32,24	183	18,5	OM	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1D9Q2	Putative uncharacterized protein	45,17	32,19	379	42,5	OM	Metabolism	Metabolism	Lipid transport and metabolism
D1DEF0	Putative uncharacterized protein	28,03	22,68	441	47,9	OM	Cellular processes and signaling	Cellular processes and signaling	Cell wall/membrane biogenesis
D1DDI4	Opacity protein (Fragment)	26,15	30,36	168	18,9	OM	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DGN5	Hemoglobin-haptoglobin utilization protein B	24,26	8,53	809	90,5	OM	Metabolism	Metabolism	Transport
D1DPV6	Putative uncharacterized protein	15,15	4,89	120	136,4	OM	Metabolism	Metabolism	Transport
D1DGP8	Putative uncharacterized protein	5,85	9,82	275	29,4	OM	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
Q50988	Pic iron-binding protein	241,07	60,25	317	34,2	P	Metabolism	Metabolism	Transport
D1DEL4	Putative uncharacterized protein	135,50	74,75	202	21,7	P	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1D9Q0	Spermidine/putrescine ABC transporter	126,10	71,74	407	44,3	P	Metabolism	Metabolism	Transport
Q5FA28	Putative ABC transporter, Pic binding protein, polyamine	85,23	56,35	378	41,2	P	Metabolism	Metabolism	Transport
D1DLL3	Thiamin-binding Pic protein	78,30	51,05	333	36,3	P	Metabolism	Metabolism	Transport
D1DN39	Amino acid permease substrate-binding protein	76,77	70,55	275	28,8	P	Metabolism	Metabolism	Transport
D1DLG4	Antigenic protein	65,14	54,74	274	29,1	P	Metabolism	Metabolism	Transport
D1DH98	Pic serine protease	55,43	15,23	499	52,5	P	Cellular processes and signaling	Cellular processes and signaling	Proteolysis
E8SRE0	Putative cytochrome	42,86	29,35	201	21,3	P	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DK08	Amino acid ABC transporter	41,99	42,91	268	28,8	P	Metabolism	Metabolism	Transport
D1DDS3	Putative uncharacterized protein	40,00	35,76	151	16,0	P	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized

Accession number	Protein name	Score	Cov.	AAs	MW [kDa]	Subcell location	COG general categories	COG description	functional
D1DK89	Thiol:disulfide interchange protein DsbA	35,46	43,53	232	25,2	P	Metabolism	Energy production and conversion	production and conversion
D6JMM1	Putative uncharacterized protein	27,66	27,93	111	11,1	P	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DID0	C-type cytochrome	20,84	35,53	152	16,1	P	Metabolism	Energy production and conversion	production and conversion
D1D856	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	18,78	28,63	262	29,9	P	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DFU3	Thiol:disulfide interchange protein	10,39	18,69	214	24,0	P	Metabolism	Energy production and conversion	production and conversion
D1DGL4	Iron(III) ABC transporter	9,10	15,89	321	34,2	P	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
Q9K360	Lipoprotein	252,01	79,86	288	31,3	IM	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DC54	Carboxy-terminal processing protease	217,71	52,55	491	52,7	IM	Cellular processes and signaling	Proteolysis	
D1DDT5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	210,56	48,95	333	35,9	IM	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DIK9	YhbX/YhjW/Yjip/YjdB family protein	70,81	24,63	544	61,3	IM	Metabolism	Metabolism	
D1DGP6	Toluene tolerance protein r	61,42	50,51	196	21,0	IM	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DQB1	Thiol:disulfide interchange protein DsbD	60,47	13,70	613	66,3	IM	Metabolism	Energy production and conversion	production and conversion
E8SQ35	Putative murein hydrolase	52,93	30,56	324	35,6	IM	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
C1HYV3	Membrane fusion protein mtrC	40,81	36,43	409	43,4	IM	Metabolism	Transport	
D1DL38	Protease OS=Neisseria gonorrhoeae	38,25	20,73	328	35,9	IM	Cellular processes and signaling	Proteolysis	
D1DL79	Pic thioredoxin OS=Neisseria gonorrhoeae	32,41	53,13	160	17,6	IM	Metabolism	Energy production and conversion	production and conversion
D1DA24	Antibiotic resistance efflux pump component	28,09	8,53	106	113,9	IM	Metabolism	Transport	
B4RJL2	Spermidine/putrescine ABC transporter, ATP-binding protein	27,11	33,04	342	38,7	IM	Metabolism	Transport	
D1DJW6	Lipoprotein OS=Neisseria gonorrhoeae	19,16	39,63	217	23,2	IM	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized

D1DGB1	Integral membrane protein	14,45	8,32	469	52,1	IM	Poorly characterized	Poorly characterized
Q5F9N3	Putative uncharacterized protein	13,48	10,38	424	46,1	IM	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DL01	Integral membrane protein	13,40	20,21	193	21,1	IM	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DK42	Type IV pilus assembly protein	10,02	8,54	410	45,3	IM	Metabolism	Protein secretion
B4RLA5	Putative D-lactate dehydrogenase	8,27	7,28	563	63,3	IM	Metabolism	Energy production and conversion
Q5F4Z4	ATP synthase subunit b	8,13	12,18	156	17,1	IM	Metabolism	Energy production and conversion
E8SPK8	Putative uncharacterized protein	7,14	9,32	558	62,0	IM	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DIT4	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	6,88	4,26	587	64,4	IM	Metabolism	Energy production and conversion
D1DFT7	OmpA/MotB domain-containing protein	6,09	11,57	216	22,4	IM	Poorly characterized	Poorly characterized
C1HYB9	Pyruvate dehydrogenase E1 component	126,11	34,95	887	99,6	C	Metabolism	Energy production and conversion
D1DDE9	Putative uncharacterized protein	108,79	35,62	393	42,3	C	Poorly characterized	Poorly characterized
B4RRA1	60 kDa chaperonin	92,00	40,44	544	57,3	C	Cellular processes and signaling	Protein turnover/Chaperones
D1DK35	Putative uncharacterized protein	85,82	38,05	389	44,5	C	Poorly characterized	Poorly characterized
D1EIA2	Elongation factor Tu (Fragment)	79,96	44,35	372	40,7	C	Information storage and processing	Translation
E8SMU8	Probable malate:quinone oxidoreductase	42,65	24,63	479	53,2	C	Metabolism	Energy production and conversion
D1DFE8	Putative uncharacterized protein	39,50	28,49	516	57,1	C	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DHF9	Phosphoenolpyruvate synthase	36,80	18,26	794	87,2	C	Metabolism	Metabolism
B4RQX1	30S ribosomal protein S7	35,26	55,97	134	15,1	C	Information storage and processing	Translation
D1D826	Trifunctional thioresoxin/sulfoxide reductase A/B protein	33,11	22,22	522	57,9	C	Metabolism	Protein turnover/Chaperones
Q5F4Z0	ATP synthase subunit beta	32,58	31,40	465	50,4	C	Cellular processes and signaling	Energy production and conversion

Accession number	Protein name	Score	Cov.	AAs	MW [kDa]	Subcell location	COG general cathegories	COG functional description
Q5F4Z2	ATP synthase subunit alpha	28,22	17,28	515	55,2	C	Cellular processes and signaling	Energy production and conversion
B4RK29	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	20,55	11,76	706	76,3	C	Information storage and processing	Transcription
B4RP29	Chaperone protein DnaK	17,44	13,08	627	67,3	C	Cellular processes and signaling	Protein turnover/Chaperones
D1DB31	Zinc-binding alcohol dehydrogenase	16,44	19,21	354	37,9	C	Metabolism	Energy production and conversion
D1DIT7	Citrate synthase	12,50	11,71	427	48,1	C	Metabolism	Energy production and conversion
D1EF31	Alpha-ketoglutarate decarboxylase	12,19	7,01	941	104,9	C	Metabolism	Energy production and conversion
B4RQE9	Proline dehydrogenase	11,58	5,00	120	129,7	C	Information storage and processing	Metabolism
D1DHK8	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	9,66	7,93	290	31,8	C	Metabolism	Metabolism lipid
A9M3X0	Elongation factor G	9,53	5,99	701	77,2	C	Information storage and processing	Translation
Q5FSR2	50S ribosomal protein L1	9,27	16,88	231	24,1	C	Information storage and processing	Translation
D1DF73	L-lactate dehydrogenase	8,12	6,92	390	43,4	C	Metabolism	Energy production and conversion
D1DFE6	Pyruvate dehydrogenase O	7,73	3,70	594	61,8	C	Metabolism	Energy production and conversion
B4RLH9	Acetyl-coenzyme A	6,75	7,89	317	35,1	C	Metabolism	Metabolism lipid
A9LZL4	Enolase	6,53	5,61	428	46,1	C	Metabolism	Energy production and conversion
D1DFE5	Dihydro lipamide acetyltransferase O	6,26	5,19	520	53,8	C	Metabolism	Metabolism carbon



Q9K217	GNAI220	6,17	8,25	315	34,5	C	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
A9M088	30S ribosomal protein S9	6,04	28,46	130	14,4	C	Information processing	Information storage and processing	Translation
A1KTM6	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	5,64	5,41	388	41,3	C	Metabolism	Metabolism	Metabolism
D6IID6	Penicillin-binding protein 1A	366,03	61,65	798	88,5	E	Cellular processes and signaling	Cellular processes and signaling	Cell wall/ Membrane biogenesis
D1DRC3	Putative uncharacterized protein	41,93	56,82	176	18,3	E	Cellular processes and signaling	Cellular processes and signaling	Cell wall/ Membrane biogenesis
D1E8J6	Lipoprotein	501,20	63,52	381	42,0	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DLR1	IgA-specific serine endopeptidase	332,83	22,28	1468	160,4	U	Cellular processes and signaling	Cellular processes and signaling	Proteolysis
D1DK29	Putative uncharacterized protein	326,48	73,61	288	31,5	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1EANI	Thiol:disulfide interchange protein	232,22	51,54	260	28,6	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1EHE4	Adhesin MafA2	167,94	74,76	313	33,9	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1EF19	Putative uncharacterized protein	166,44	67,65	204	23,0	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
E8SQ63	Putative uncharacterized protein	142,83	64,98	237	26,7	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
C1I0N1	Adhesin (Fragment)	133,24	55,35	271	29,4	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DIE8	Lipoprotein	131,47	72,22	126	13,5	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1D4E3	Protease Ig A	128,87	13,31	1593	175,9	U	Cellular processes and signaling	Cellular processes and signaling	Proteolysis
Q50940	Carbonic anhydrase	117,35	62,70	252	28,1	U	Metabolism	Metabolism	Metabolism
D1E117	Cryptic protein	116,73	64,53	203	22,6	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DI47	Pic protein	109,25	51,28	234	25,5	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DL19	Adhesin component	89,11	35,14	185	20,3	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DBU1	Pic protein	87,39	26,22	614	68,1	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
B4RKG6	Type IV pilus assembly protein PilX	77,46	56,65	203	22,0	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
E8SKV4	Putative TonB-dependent receptor protein	76,23	35,49	758	84,9	U	Metabolism	Metabolism	Transport
B4RIZ4	Uncharacterized protein	67,57	55,15	165	18,6	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized
D6H8T6	Putative uncharacterized protein	62,38	72,39	268	30,1	U	Poorly characterized	Poorly characterized	Poorly characterized

Accession number	Protein name	Score	Cov.	AAs	MW [kDa]	Subcell location	COG general cathegories	COG functional description
D1DEF7	Large pilS cassette protein (Fragment)	46,07	11,40	228	24,3	U	Metabolism	Cell adhesion
D6HA37	Putative uncharacterized protein	43,93	55,36	112	11,5	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1D652	Putative uncharacterized protein	42,10	30,12	166	19,1	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DGF3	Cytochrome c5	40,72	26,16	279	28,7	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DKZ7	Pic protein	40,25	45,99	274	29,4	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DHP6	Lipoprotein	39,02	57,86	159	17,6	U	Cellular processes and signaling	Cell wall/membrane biogenesis
B4RNQ4	Putative OM protein OmpU	38,59	28,78	469	53,9	U	Poorly characterized	Poorly characterized
Q5F9F7	Putative lipoprotein carrier	35,77	30,57	193	21,2	U	Metabolism	Protein transport
B4RPX8	Uncharacterized protein	29,99	32,07	184	20,1	U	Cellular processes and signaling	Poorly characterized
E8SQT6	Glutamate dehydrogenase	27,68	19,14	444	48,4	U	Metabolism	Metabolism amino acids
D1DIZ2	Predicted protein	26,89	31,71	82	9,5	U	Poorly characterized	Poorly characterized
C1HXS4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	23,25	17,97	512	56,8	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DL16	Pic protein	22,70	14,81	216	23,3	U	Poorly characterized	Poorly characterized
E8SM17	Putative uncharacterized protein	22,63	48,41	126	13,8	U	Poorly characterized	Poorly characterized
C1HVD6	Putative uncharacterized protein	22,22	27,46	142	15,4	U	Poorly characterized	Poorly characterized
E8SNL7	Putative phospholipase D-family protein	19,42	11,68	488	55,2	U	Metabolism	Metabolism
D1DIS9	Peroxiredoxin 2 family protein	19,22	31,43	245	26,9	U	Metabolism	Energy production and conversion
D1DL54	Lipoprotein	18,13	26,67	300	31,3	U	Cellular processes and signaling	Metabolism
D1D996	Putative uncharacterized protein	17,48	50,00	100	11,1	U	Poorly characterized	Poorly characterized
B4RPN6	Lipoprotein	17,32	59,84	127	14,4	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DHM9	Cell division protein FtsN	16,39	11,85	346	37,0	U	Poorly characterized	Poorly characterized

D1DKR3	Lipoprotein	14,91	13,31	338	36,8	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DFA2	Membrane bound Murein transglycosylase	12,17	3,95	658	72,0	U	Cellular processes and signaling	Cell wall/ Membrane biogenesis
D1DJC9	Pic protein	11,95	19,41	170	18,5	U	Poorly characterized	Poorly characterized
B4RJ54	Uncharacterized protein	11,78	11,67	377	43,1	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DI43	Pic protein	11,25	54,21	107	11,8	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DCY3	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	10,56	12,32	487	52,3	U	Metabolism	Metabolism purines
B4RN35	Lipoprotein	9,83	27,91	172	18,8	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DZV3	Large pilS cassette protein	9,81	14,10	234	24,9	U	Cellular processes and signaling	Cell adhesion
B4RIK0	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme	9,65	15,44	259	28,2	U	Metabolism	Cell wall/membrane biogenesis
D1DIZ3	Predicted protein	9,30	10,00	110	11,7	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DBK9	Secreted protein	9,18	25,71	140	15,7	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DB83	Cell division protein ZipA	7,75	5,84	428	46,9	U	Cellular processes and signaling	Cell division
B4RQE2	Uncharacterized protein	7,70	17,30	289	31,6	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DK28	Putative uncharacterized protein	7,62	9,52	252	28,5	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DC69	Putative uncharacterized protein	7,45	18,13	160	17,1	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DJU2	Putative uncharacterized protein	7,13	14,65	157	17,0	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DB90	Putative uncharacterized protein (Fragment)	7,06	17,05	176	19,6	U	Poorly characterized	Poorly characterized
D1DD12	Pic protein	6,34	11,66	223	23,7	U	Metabolism	Protein transport
C1HUY1	Lipoprotein	6,30	32,22	90	10,5	U	Poorly characterized	Poorly characterized
C1HXZ8	Lipoprotein	5,30	16,39	122	13,1	U	Poorly characterized	Poorly characterized

**ANEXO 3. TABLA DE RNAs IDENTIFICADOS EN LA RNA-seq DE MVs OBTENIDAS A DISTINTOS TIEMPOS.**

**Tabla A2. Genes diferencialmente expresados en alguno de los puntos al menos en un 30%.**

El LogFC indica el cambio en la expresión entre dos puntos. El valor negativo indica que está más expresado en MVs de 1,6. Las diferencias no fueron significativas en ningún RNA. En la tabla se indica también el número de secuencias (Nº reads) por RNA y punto.

Nº	GeneID	LogFC		Nº reads		Biotype	Gene Name
		2,1 vs 1,6	2,1 vs 1,9	1,6 vs 1,9	2,1 vs 2,1		
1	PA0263.1	-0,75	-0,64	1521,5	665	81,5	tRNA
2	PA0729.1	-0,70	-0,63	183794,5	94400	5853,5	tRNA
3	PA2775.1	-0,65	-0,57	549,5	307,5	59	tRNA
4	PA2603.1	-0,63	-0,62	193,5	151	21,5	tRNA
5	PA2852.1	-0,63	-0,56	1456,5	838	125,5	tRNA
6	PA3031.1	-0,62	-0,55	4766,5	2634,5	419	tRNA
7	PA1804.1	-0,60	-0,58	7353	5561	689,5	tRNA
8	PA2966	-0,59	-0,52	427,5	244	57	protein_coding acpP
9	PA4277.3	-0,56	-0,50	3105	1719,5	408	tRNA
10	PA4669.1	-0,56	-0,53	3571,5	2343	423	tRNA
11	PA2581.1	-0,55	-0,48	900,5	489	134	tRNA
12	PA0905	-0,55	-0,50	71,5	51	16,5	protein_coding rsmA
13	PA1796.3	-0,55	-0,50	3122	1933	422,5	tRNA
14	PA0779	-0,54	-0,46	249	130	45	protein_coding probable ATP-dependent protease
15	PA2736.1	-0,54	-0,51	193	124,5	27	tRNA
16	PA0905.1	-0,54	-0,49	4737,5	2922,5	721	tRNA
17	PA4277.2	-0,54	-0,49	556	300,5	87	tRNA
18	PA1013.1	-0,53	-0,49	10605,5	6981	1458,5	tRNA
19	PA0527.1	-0,51	-0,46	3567	2013,5	648	ncRNA rsm Y
20	PA4541.2	-0,51	-0,48	1119,5	755,5	170	tRNA
21	PA0652	-0,50	-0,38	161,5	70	35	protein_coding vfr

22	PA1596	-0,49	-0,46	365,5	289,5	80	protein_coding	
23	PA4726.11	-0,49	-0,35	857,5	289,5	180,5	ncRNA	crcZ
24	PA0922.1	-0,48	-0,46	3600	2158,5	515,5	tRNA	
25	PA4525	-0,47	-0,39	174	94	47	protein_coding	pilA
26	PA5160.1	-0,47	-0,41	1396	862,5	347,5	tRNA	
27	PA3366.1	-0,47	-0,41	81,5	48,5	24,5	ncRNA	amiL
28	PA5054	-0,47	-0,44	172	125,5	46	protein_coding	hslU
29	PA0085	-0,47	-0,35	91	42	26	protein_coding	hcpI
30	PA4802.1	-0,46	-0,45	71	53	20,5	tRNA	
31	PA4746.2	-0,46	-0,41	2083	1319,5	551	tRNA	
32	PA1493	-0,46	-0,48	73,5	80,5	24,5	protein_coding	cysP
33	PA4232	-0,46	-0,38	57	33	18	protein_coding	ssb
34	PA3807	-0,45	-0,33	83,5	42,5	27	protein_coding	ndk
35	PA4761	-0,45	-0,42	912,5	709	261	protein_coding	dnaK
36	PA4762	-0,44	-0,43	108	85	32	protein_coding	grpE
37	PA0714.1	-0,44	-0,39	5029	3071,5	1653	ncRNA	phrD
38	PA3621.1	-0,44	-0,39	3979	2534	1247	ncRNA	rsmZ
39	PA5053	-0,43	-0,38	48,5	38	14,5	protein_coding	hslV
40	PA0659	-0,43	-0,32	97	45,5	28,5	protein_coding	hypothetical protein
41	PA1198	-0,42	-0,38	486,5	316	157,5	protein_coding	conserved hypothetical protein
42	PA0634	-0,42	-0,41	1556	1400	531	protein_coding	hypothetical protein
43	PA4746.1	-0,42	-0,36	121,5	65,5	45	tRNA	PA4746.1
44	PA4694	-0,42	-0,35	62	39,5	24,5	protein_coding	ilvC
45	PA1939	-0,42	-0,30	149,5	69,5	56,5	protein_coding	hypothetical protein
46	PA1796.1	-0,42	-0,44	112,5	103,5	29,5	tRNA	
47	PA4542	-0,41	-0,39	439	329,5	153,5	protein_coding	clpB
48	PA0826.2	-0,41	-0,35	19046,5	9814	6986,5	tmRNA	ssrA

N°	GeneID	LogFC		N° reads 1,6	N° reads 1,9	N° reads 2,1	Biotype	Gene Name
		2,1 vs 1,6	2,1 vs 1,9					
49	PA0614	-0,41	-0,32	511	237	159,5	protein_coding	hypothetical protein
50	PA3824.1	-0,41	-0,34	277,5	166	92	tRNA	
51	PA5257	-0,41	-0,33	148	85	62,5	protein_coding	hypothetical protein
52	PA4276.1	-0,41	-0,42	167	143	46	tRNA	
53	PA3446	-0,40	-0,34	126	85	50,5	protein_coding	conserved hypothetical protein
54	PA0887	-0,40	-0,39	113	93,5	43	protein_coding	acsA
55	PA4545	-0,40	-0,37	56	42	22,5	protein_coding	comL
56	PA4726	-0,40	-0,40	122	110	47,5	protein_coding	cbrB
57	PA4524.1	-0,40	-0,35	342,5	216,5	121,5	tRNA	PA4524.1
58	PA0651	-0,40	-0,41	111,5	105	45,5	protein_coding	trpC
59	PA4386	-0,40	-0,39	159	146,5	63,5	protein_coding	groES
60	PA1530.1	-0,40	-0,34	478	305	206,5	rRNA	ffs
61	PA4385	-0,40	-0,37	1182	927,5	465,5	protein_coding	groEL
62	PA0911	-0,40	-0,37	1077	884,5	443	protein_coding	hypothetical protein
63	PA0648	-0,40	-0,36	793	597,5	358,5	protein_coding	hypothetical protein
64	PA5435	-0,39	-0,39	62	51	24,5	protein_coding	probable transcarboxylase subunit
65	PA5412	-0,39	-0,29	66,5	37,5	26,5	protein_coding	hypothetical protein
66	PA4661	-0,39	-0,41	119,5	116	45	protein_coding	pagL
67	PA0908	-0,39	-0,37	224	164	79	protein_coding	hypothetical protein
68	PA0141	-0,39	-0,36	56,5	40	22	protein_coding	conserved hypothetical protein
69	PA0910	-0,39	-0,38	205,5	180,5	82	protein_coding	hypothetical protein
70	PA2623	-0,39	-0,36	186,5	145,5	87,5	protein_coding	icd
71	PA3262	-0,38	-0,37	60	45	23,5	protein_coding	probable peptidyl-prolyl cis-trans isomerase%2C FkBP-type
72	PA0084	-0,38	-0,33	65,5	39,5	24,5	protein_coding	conserved hypothetical protein
73	PA0909	-0,38	-0,37	155	125	61	protein_coding	hypothetical protein

74	PA0937	-0,38	-0,34	54,5	42	27,5	protein_coding	conserved hypothetical protein
75	PA4483	-0,37	-0,31	35	24,5	15,5	protein_coding	gatA
76	PA4673.1	-0,37	-0,31	243	127,5	77	tRNA	
77	PA3413	-0,37	-0,35	38,5	28	18	protein_coding	conserved hypothetical protein
78	PA3617	-0,37	-0,34	268	187	112,5	protein_coding	recA
79	PA0865	-0,37	-0,27	167	98,5	84	protein_coding	hpd
80	PA0658	-0,37	-0,20	42	17,5	18	protein_coding	probable short-chain dehydrogenase
81	PA5149.1	-0,37	-0,29	1413,5	773	643,5	tRNA	PA5149.1
82	PA1151	-0,37	-0,33	57,5	41	28	protein_coding	imm2
83	PA2582	-0,36	-0,35	32,5	26	15	protein_coding	hypothetical protein
84	PA4277.1	-0,36	-0,33	308,5	179,5	111	tRNA	PA4277.1
85	PA5240	-0,36	-0,27	161	86,5	74	protein_coding	trxA
86	PA5258	-0,36	-0,19	45,5	22	22,5	protein_coding	hypothetical protein
87	PA3861	-0,36	-0,31	46	29,5	19,5	protein_coding	rhl
88	PA0922	-0,36	-0,30	125	83	55	protein_coding	hypothetical protein
89	PA0613	-0,36	-0,38	643,5	697,5	316,5	protein_coding	hypothetical protein
90	PA0647	-0,35	-0,34	379,5	318,5	191	protein_coding	hypothetical protein
91	PA3153	-0,35	-0,38	28	28,5	16,5	protein_coding	wzx
92	PA0336	-0,35	-0,23	61	29,5	26	protein_coding	ygqP
93	PA4943	-0,34	-0,27	67,5	39	31,5	protein_coding	probable GTP-binding protein
94	PA4387	-0,34	-0,34	37	26	15	protein_coding	conserved hypothetical protein
95	PA0624	-0,34	-0,36	1870,5	2157	1093,5	protein_coding	hypothetical protein
96	PA0615	-0,34	-0,31	452	312,5	229	protein_coding	hypothetical protein
97	PA0622	-0,34	-0,35	7378,5	7875,5	4533	protein_coding	probable bacteriophage protein
98	PA0645	-0,34	-0,30	107,5	82,5	64	protein_coding	hypothetical protein
99	PA0962	-0,34	-0,33	50,5	45	27	protein_coding	probable dna-binding stress protein
100	PA0654	-0,33	-0,32	93,5	69,5	45,5	protein_coding	speD
101	PA5304	-0,33	-0,34	103	90,5	47,5	protein_coding	dadA

N°	GeneID	LogFC		N° reads 1,6	N° reads 1,9	N° reads 2,1	Biotype	Gene Name
		2,1 vs 1,6	2,1 vs 1,9					
102	PA0395	-0,33	-0,28	29,5	18,5	14,5	protein_coding	pilT
103	PA3621	-0,33	-0,30	95,5	62,5	46,5	protein_coding	fdxA
104	PA4974	-0,33	-0,26	57,5	30,5	26	protein_coding	probable outer membrane protein precursor
105	PA1431	-0,33	-0,24	39,5	22,5	20	protein_coding	rsaL
106	PA4441	-0,33	-0,35	27,5	25	16	protein_coding	hypothetical protein
107	PA0260	-0,33	-0,16	36	16,5	21,5	protein_coding	hypothetical protein
108	PA5445	-0,33	-0,20	54,5	27,5	30	protein_coding	probable coenzyme A transferase
109	PA0936	-0,32	-0,29	44	29,5	23	protein_coding	lpXO2
110	PA1432	-0,32	-0,30	114,5	93	67,5	protein_coding	lasI
111	PA0623	-0,32	-0,34	2097,5	2327	1325,5	protein_coding	probable bacteriophage protein
112	PA4464	-0,32	-0,30	81	59	46	protein_coding	ptsN
113	PA2976	-0,32	-0,25	74,5	44	40,5	protein_coding	rne
114	PA1159	-0,32	-0,33	29	24,5	17,5	protein_coding	probable cold-shock protein
115	PA3903	-0,32	-0,34	26,5	24	15,5	protein_coding	prfC
116	PA3496	-0,32	-0,36	36	36	22,5	protein_coding	hypothetical protein
117	PA0646	-0,32	-0,32	1757	1669,5	1212,5	protein_coding	hypothetical protein
118	PA4333	-0,32	-0,34	32,5	28	17,5	protein_coding	probable fumarase
119	PA2624	-0,32	-0,31	63,5	46,5	30,5	protein_coding	idh
120	PA0907	-0,32	-0,32	111,5	106,5	61	protein_coding	hypothetical protein
121	PA0633	-0,32	-0,34	1079,5	1114,5	635	protein_coding	hypothetical protein
122	PA3134	-0,32	-0,33	27,5	21,5	15	protein_coding	gltX
123	PA3183	-0,32	-0,29	69	48	36,5	protein_coding	zwf
124	PA3616	-0,32	-0,27	35	26,5	21	protein_coding	conserved hypothetical protein
125	PA4461	-0,32	-0,14	34	15	17,5	protein_coding	probable ATP-binding component of ABC transporter
126	PA2639	-0,32	-0,23	37,5	21,5	18,5	protein_coding	nuoD
127	PA3271	-0,32	-0,22	28,5	18,5	14,5	protein_coding	probable two-component sensor



128	PA3244	-0,32	-0,27	82,5	57,5	54	protein_coding	minD
129	PA2952	-0,32	-0,23	47	29	27	protein_coding	etfB
130	PA0629	-0,32	-0,33	527	509,5	333	protein_coding	conserved hypothetical protein
131	PA0649	-0,31	-0,29	72	56	42	protein_coding	trpG
132	PA2742	-0,31	-0,28	29,5	20	15,5	protein_coding	rpmI
133	PA0650	-0,31	-0,35	100,5	106	58	protein_coding	trpD
134	PA1288	-0,31	-0,23	63,5	37,5	36	protein_coding	probable outer membrane protein precursor
135	PA5241	-0,31	-0,21	44,5	23,5	24	protein_coding	ppx
136	PA1750	-0,31	-0,24	32	18,5	16	protein_coding	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase
137	PA0888	-0,31	-0,27	37,5	28,5	22	protein_coding	aotJ
138	PA1080	-0,31	-0,35	25,5	22,5	14,5	protein_coding	flgE
139	PA5255	-0,31	-0,26	56,5	38,5	33	protein_coding	algQ
140	PA3531	-0,31	-0,36	85,5	99	58	protein_coding	bfrB
141	PA2830	-0,30	-0,41	34	37	15,5	protein_coding	hipX
142	PA0644	-0,30	-0,35	881,5	1036,5	615,5	protein_coding	hypothetical protein
143	PA1592	-0,30	-0,26	96	73	58	protein_coding	hypothetical protein
144	PA0070	-0,30	-0,23	67	39	39	protein_coding	hypothetical protein
145	PA4741	-0,30	-0,27	54,5	41	37,5	protein_coding	rpsO
146	PA0081	-0,30	-0,28	33	23,5	19,5	protein_coding	fhaI
147	PA4918	0,30	0,06	18	44,5	189,5	protein_coding	hypothetical protein
148	PA0805	0,36	0,17	16	26,5	230,5	protein_coding	hypothetical protein
149	PA3818	0,41	0,35	16,5	15,5	219,5	protein_coding	extragenic suppressor protein SuhB

## **IX. PUBLICACIONES**



## New Type of Outer Membrane Vesicle Produced by the Gram-Negative Bacterium *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup>: Implications for DNA Content

Carla Pérez-Cruz,<sup>a</sup> Ornella Carrión,<sup>a</sup> Lidia Delgado,<sup>a</sup> Gemma Martínez,<sup>b</sup> Carmen López-Iglesias,<sup>b</sup> Elena Mercade<sup>a</sup>

Laboratori de Microbiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain<sup>a</sup>; Crío-Microscòpia Electrònica, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain<sup>b</sup>

Outer membrane vesicles (OMVs) from Gram-negative bacteria are known to be involved in lateral DNA transfer, but the presence of DNA in these vesicles has remained difficult to explain. An ultrastructural study of the Antarctic psychrotolerant bacterium *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> has revealed that this Gram-negative bacterium naturally releases conventional one-bilayer OMVs through a process in which the outer membrane is exfoliated and only the periplasm is entrapped, together with a more complex type of OMV, previously undescribed, which on formation drag along inner membrane and cytoplasmic content and can therefore also entrap DNA. These vesicles, with a double-bilayer structure and containing electron-dense material, were visualized by transmission electron microscopy (TEM) after high-pressure freezing and freeze-substitution (HPF-FS), and their DNA content was fluorometrically quantified as  $1.8 \pm 0.24$  ng DNA/ $\mu$ g OMV protein. The new double-bilayer OMVs were estimated by cryo-TEM to represent 0.1% of total vesicles. The presence of DNA inside the vesicles was confirmed by gold DNA immunolabeling with a specific monoclonal IgM against double-stranded DNA. In addition, a proteomic study of purified membrane vesicles confirmed the presence of plasma membrane and cytoplasmic proteins in OMVs from this strain. Our data demonstrate the existence of a previously unobserved type of double-bilayer OMV in the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> that can incorporate DNA, for which we propose the name outer-inner membrane vesicle (O-IMV).

In recent years, many studies have been conducted on outer membrane vesicles (OMVs) produced by Gram-negative bacteria (1). It is now commonly accepted that these small spherical structures (20 to 250 nm) are extruded from the outer membrane of the cell and thus contain bacterial lipids, outer membrane proteins, periplasmic content, and other insoluble components that are delivered to the environment to accomplish several functions. OMVs are involved in pathogenesis, interspecies communication, biofilm formation, nutrient acquisition, and DNA transfer (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). The presence of DNA inside bacterial OMVs and the possibility that these structures constitute a new mechanism of lateral gene transfer have important implications in several areas, including prokaryotic evolution and in particular the transfer of antibiotic resistance genes or virulence genes within bacteria (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19). Although reported in several studies, the presence of DNA in OMVs has remained difficult to explain, particularly since all the vesiculation mechanisms proposed to date rule out the presence of any cytoplasmic membrane and therefore of any cytoplasmic components (1, 6, 18, 20). Clearly, OMVs encapsulate DNA, but the mechanism of DNA packaging into OMVs has not been conclusively demonstrated (1, 9, 16).

Various models have been proposed to explain DNA packaging into OMVs (4, 9, 16). In one model, extracellular DNA released after bacterial lysis is internalized in the vesicles by a mechanism similar to that used in bacterial transformation. Renelli and coworkers reinforced this model by demonstrating that OMVs can take up “naked” plasmid DNA (16). They also proposed that exogenous DNA can be internalized by the opening and closing of a small proportion of OMVs, but the amount of DNA detected could not be explained if this was the only active mechanism. Another model involves the incorporation of DNA into OMVs before their release. In this case, it is assumed that the DNA some-

how passes from the cytoplasm through the plasma membrane to be encapsulated within an OMV once in the periplasm. Although these models have not been sufficiently backed up by experimental evidence, it has been suggested that probably both these naturally occurring mechanisms are involved in DNA incorporation into OMVs (8, 9, 16).

A third model was proposed by Kadurugamuwa and Beveridge (4) to explain the presence of some cytoplasmic constituents in natural and gentamicin-induced OMVs from *Pseudomonas aeruginosa*. They suggested that the peptidoglycan layer can be weakened by autolysins and that transient and localized breaches in the peptidoglycan can lead to the formation of what they called complicated OMVs, which contain both inner and outer membranes as well as cytoplasmic components such as DNA. However, the images provided by transmission electron microscopy (TEM) were inconclusive, and the existence of a new type of double-layered membrane vesicle was not demonstrated.

Since their study, methods for analyzing bacteria with thin-section TEM have greatly improved (21). Vitrification of specimens by high-pressure freezing (HPF) and freeze-substitution (FS) preserves structural details almost in the “native” state, and

Received 26 November 2012 Accepted 5 January 2013

Published ahead of print 11 January 2013

Address correspondence to Elena Mercade, mmercade@ub.edu.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03657-12>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.03657-12

The authors have paid a fee to allow immediate free access to this article.

this approach is also theoretically the best for preserving structure under conditions compatible with immunogold labeling (22). Our research group has used TEM after HPF and FS to show that cold-adapted Antarctic bacteria produce huge amounts of OMVs that accumulate in their extracellular matter (23, 24). Specifically, *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> was named on the basis of its considerable capacity for producing OMVs (25), which makes it a potentially excellent model for studying the vesiculation process. Previous structural studies with this strain allowed us to observe that this Gram-negative bacterium produces different types of OMVs, including conventional vesicles with a single bilayer and another, more complex type with a double bilayer and containing electron-dense material.

We here report TEM, cryo-TEM, and proteomic studies conducted to confirm a new model of vesiculation in *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> that leads to the formation of a different type of outer membrane vesicle with a double-bilayer structure, which encapsulates DNA and thus could be involved in DNA transfer.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacteria and growth conditions.** All studies were performed with the cold-adapted Antarctic bacterium *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup>, which grows at temperatures ranging from  $-4^{\circ}\text{C}$  to  $34^{\circ}\text{C}$ . For TEM, *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> was grown on Trypticase soy agar (TSA) (Oxoid) for 5 days at  $15^{\circ}\text{C}$ , and for OMV isolation, the strain was grown on Trypticase soy broth (TSB) (Oxoid) for 2 days at  $15^{\circ}\text{C}$ , unless otherwise specified. For liquid cultures, an orbital shaker at 100 rpm was used.

**High-pressure freezing and freeze-substitution (HPF-FS) of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>.** For the TEM observation of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> cells, electron microscopy analysis of Epon-embedded thin sections was performed as described by Frias et al. (23). Briefly, bacterial colonies were cryoimmobilized using a Leica EMPact high-pressure freezer (Leica, Vienna, Austria). Frozen samples were freeze-substituted in a Leica EM automatic freeze substitution (AFS) system (Leica, Vienna, Austria), where the substitution was performed in pure acetone containing 2% (wt/vol) osmium tetroxide and 0.1% (wt/vol) uranyl acetate at  $-90^{\circ}\text{C}$  for 72 h. The temperature was gradually increased ( $5^{\circ}\text{C}/\text{h}$ ) to  $4^{\circ}\text{C}$ , held constant for 2 h, and then finally increased to room temperature and maintained for 1 h. Samples were washed for 1 h in acetone at room temperature and infiltrated in a graded series of Epon-acetone mixtures: 1:3 for 2 h, 2:2 for 2 h, 3:1 for 16 h, and pure Epon 812 (Ted Pella, Inc.) for 30 h. Samples were embedded in fresh Epon and polymerized at  $60^{\circ}\text{C}$  for 48 h.

**Sectioning and electron microscopy analysis.** Ultrathin sections were cut with a Leica UCT ultramicrotome and mounted on Formvar carbon-coated copper grids. Sections were poststained with 2% (wt/vol) aqueous uranyl acetate and lead citrate and examined in a Tecnai Spirit electron microscope (FEI Company, Netherlands) at an acceleration voltage of 120 kV. Vesicle size was determined with the program analySIS (Soft Imagine System, Switzerland).

**Isolation and purification of OMVs from culture medium.** OMVs from *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> naturally secreted into the medium were collected from broth cultures (500 ml) in the late log phase by an adaptation of the method described by McBroom and coworkers (26). The cells were pelleted by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , and the supernatant was filtered through 0.45- $\mu\text{m}$ -pore-size filters to remove remaining bacterial cells. OMVs were obtained by centrifugation at  $38,400 \times g$  for 1 h at  $4^{\circ}\text{C}$  in an Avanti J-20 XP centrifuge (Beckman Coulter, Inc.). Pelleted vesicles were resuspended in 25 ml of 50 mM HEPES (pH 6.8) and filtered through 0.45- $\mu\text{m}$ -pore-size Ultrafree spin filters (Millipore). Vesicles were again pelleted as described above and finally resuspended in an adequate volume of 50 mM HEPES, pH 6.8.

Vesicles were further purified for proteomic analysis using a method adapted from that described by Horstman and Kuehn (3). The crude vesicle sample was adjusted to 45% OptiPrep density gradient medium

(Sigma) in 10 mM HEPES–0.85% (wt/vol) NaCl (pH 6.8) (HEPES–NaCl). OptiPrep gradients were layered over the 4-ml crude vesicle sample and centrifuged ( $100,000 \times g$ , 20 h), and fractions of equal volume were removed sequentially from the top. A portion of each fraction was visualized by 12% SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Fractions containing vesicles were pooled, dialyzed with 10 mM HEPES, and concentrated with Amicon ultracentrifugal filter devices (Millipore).

**DNA immunolabeling of OMV thin sections.** *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> OMVs were isolated as described above. Before carrying out HPF-FS and immunolabeling, vesicle samples were treated with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNase I (Sigma) and 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ ) to remove the DNA outside the vesicles. HPF-FS of OMVs was done as described above but with the following modifications to perform further immunolabeling. After HPF, substitution was performed in pure methanol containing 0.5% (wt/vol) uranyl acetate at  $-90^{\circ}\text{C}$  for 80 h. The temperature was gradually increased ( $5^{\circ}\text{C}/\text{h}$ ) to  $-50^{\circ}\text{C}$ . Samples were then washed for 3.5 h in methanol at  $-50^{\circ}\text{C}$  and infiltrated in a graded series of HM20–methanol mixtures: 1:3 for 3 h, 2:2 overnight, 3:1 for 6 h, and 3 changes of pure HM20 (Electron Microscopy Sciences) for 48 h. Samples were polymerized at  $-50^{\circ}\text{C}$  for 24 h by indirect UV irradiation (360 nm), followed by further hardening at room temperature for 48 h. Ultrathin sections were obtained as described above. Colloidal gold DNA immunolabeling was carried out as follows. Unless specified, washing steps were carried out by floating the grids face down on drops. Grids with sections were floated on 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) for 3 min. The grids were blocked on 0.1 M PBS–50 mM glycine and rinsed with 0.1 M PBS, again with 5% bovine serum albumin (BSA) (Sigma)–0.1 M PBS (1 drop for 3 min and 1 drop for 12 min), and again with 1% BSA–0.1 M PBS (1 drop for 8 s). Next, the grids were incubated with monoclonal IgM specific for double-stranded DNA (dsDNA) (clone AC-30-10; Novus Biologicals, Littleton, CO), diluted 1/2 in 1% BSA–0.1 M PBS, for 1 h. Grids were washed for 5 min on 5 drops of 0.25% Tween 20–0.1 M PBS followed by 3 min on 1 drop of 1% BSA–0.1 M PBS. After that, grids were incubated for 30 min with a secondary goat anti-mouse antibody coupled to 12-nm colloidal gold (lot 84359; Jackson) diluted 1/20 in 1% BSA–0.1 M PBS. Grids were washed with 0.1 M PBS followed by double-distilled water and then floated on 1% glutaraldehyde–0.1 M PBS for 5 min. Grids were rinsed with double-distilled water and dried with filter paper. Finally, grids were poststained with 2% uranyl acetate–methanol for 5 min, 70% methanol for 3 min, 50% methanol for 3 min, and 30% methanol for 3 min, jet-washed with double-distilled water, air dried for 20 min, stained with lead citrate for 2 min, and jet-washed with double-distilled water. Several controls were used. First, the dsDNA monoclonal antibody was omitted. Second, a primary IgM monoclonal antibody to *Plasmodium falciparum* (clone 11B7; Acris Antibodies GmbH) with no affinity for dsDNA was also employed. Third, the grids were preincubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 6 h with 1 mg/ml DNase I (Sigma) in PBS plus 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , and then the grids were thoroughly washed with water before immunolabeling with dsDNA monoclonal antibody.

**Fluorometric quantification of DNA.** Surface-associated DNA and DNA contained within OMVs were quantified by the PicoGreen assay (Molecular Probes). For this purpose, OMVs were collected independently from three exponentially growing cultures (500 ml), and DNA was measured as described by Renelli et al. (16) with some modifications. For each experiment, two 30- $\mu\text{g}$  protein samples from OMVs were prepared. One was pretreated with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pancreatic DNase I (Sigma) and 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ ) to digest DNA located outside the OMVs, after which the DNase was inactivated. Both OMV samples were lysed with 0.125% Triton X-100 solution. Samples were further processed according to the manufacturer's instructions, and fluorescence was measured in a Hitachi F-2000 fluorescence spectrophotometer. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

**Cryo-TEM.** Isolated OMVs were visualized by cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM). A thin aqueous film was formed by dipping and withdrawing a bare specimen grid with OMVs resuspended in deionized water. Glow-discharged holey carbon grids were used. The excess

liquid was blotted with filter paper, leaving thin sample films spanning the grid holes. These films were vitrified by plunging the grid into ethane, which was kept at melting point with liquid nitrogen using a Vitrobot (FEI Company, Eindhoven, Netherlands), and the sample was maintained before freezing at 100% humidity and at room temperature. The vitreous sample films were transferred to a Tecnai F20 microscope (FEI Company, Eindhoven, Netherlands) using a Gatan cryotransfer system (Gatan Inc., Pleasanton, CA). Cryo-TEM visualizations were carried out at a temperature between  $-170^{\circ}\text{C}$  and  $-175^{\circ}\text{C}$  and an accelerating voltage of 200 kV. Images were acquired using low-dose imaging conditions and an Eagle 4k  $\times$  4k charge-coupled device (CCD) camera (FEI Company, Eindhoven, Netherlands). The different types of vesicles were analyzed, and the proportion of each was measured from digital images using the analySIS software (Soft Imagine System, Switzerland).

**Proteomic analysis.** A proteomic analysis of purified OMVs was carried out using one-dimensional (1-D) SDS-PAGE and nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis as described by Frias et al. (23). Briefly, proteins were in-gel digested with trypsin, and then tryptic peptides were extracted from the gel matrix, pooled, and dried in a vacuum centrifuge. Purified peptides were injected for chromatographic separation in a reverse-phase capillary  $\text{C}_{18}$  column, and the eluted peptides were subsequently analyzed on a nano-ESI-QTOF mass spectrometer (Q-TOF Global, Micromass-Waters). Data generated in PKL file format were submitted for database searching in the MASCOT server. For the database search, only tandem mass spectra of +2 and +3 charged ions were searched against the NCBI nonredundant protein sequence database. Proteins were identified by using the probability-based Mowse score, and individual ions scores of  $>53$  indicate identity or extensive homology ( $P < 0.05$ ). Bacterial protein subcellular localization was estimated with the software PSORTb v3.0.2 (27).

## RESULTS

In TEM observations of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> sections obtained after HPF-FS, we repeatedly noted the presence of two different types of OMVs secreted from this strain. The first were conventional OMVs, surrounded by a bilayer membrane and with diameters ranging between 25 and 200 nm (Fig. 1A and B). These vesicles were derived from the outer membrane of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> cells, as can be clearly observed in Fig. 1A. The vesicle membranes showed the same bilayer structure, width, and staining profile as the outer cell membrane. In addition, the OMVs were surrounded by the same fringe of fine fibers as the cells and contained a low-electron-density similar material to that in the periplasmic space of the cells. Unexpectedly, however, in some *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> cells we noted the formation of membrane vesicles in which both the outer membrane (OM) and plasma membrane (PM) were extruded. During this vesiculation process, we observed that cytoplasmic content (CC) also became entrapped within the vesicle (Fig. 1C to F). Vesicles formed in this way had diameters of between 100 and 250 nm and two bilayer membrane structures, i.e., the external membrane derived from the cell OM and an inner membrane corresponding to the cell PM, as Fig. 1C to F clearly depict. Inside this inner membrane, we observed an electron-dense material similar to that seen in the cell cytoplasm. Although much less common, these singular double-layered vesicles were apparent in many of the sections analyzed. They were observed more frequently out of the cell (Fig. 1D and F), and in a few cases it was possible to visualize the double-bilayer vesicles precisely at the moment of formation and before they were detached from the cell (Fig. 1C and D). Double-bilayer vesicles were observed in normal cells and not in those that were dividing. They seemed to bud preferentially from cell polar or subpolar sites but were also visualized elsewhere in the cell. It was remarkable that when ob-

served in TEM sections, several of the observed double-bilayer vesicles showed an elongated shape at the time of formation and expulsion from the cell, but once liberated, vesicles became almost round.

The presence of double-bilayer OMVs was also confirmed by cryo-TEM of thin frozen films of isolated OMVs. For this purpose, total OMVs from *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> were isolated from liquid cultures. Vesicles were collected from exponentially growing cultures to avoid the presence of lysed cells. Single-bilayer OMVs (Fig. 2, white arrow) predominated in all observed fields, but double-bilayer OMVs were also observed (black arrow), always with a round shape, unlike those in TEM sections. After counting 9,000 vesicles visualized by cryo-TEM of thin frozen foils, we found that 0.1% of the total vesicles corresponded to new double-bilayer OMVs.

OMVs obtained from liquid cultures of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> were also used to determine their DNA content before and after DNase treatment. Vesicles were retrieved by high-speed centrifugation from three exponentially growing cultures, and DNA was quantified using the PicoGreen assay, which detects double-stranded DNA with minimal interference of fluorescence due to RNA or single-stranded DNA. The DNA content of OMVs was  $2.1 \pm 0.4$  ng DNA/ $\mu\text{g}$  OMV protein before DNase treatment and  $1.8 \pm 0.24$  ng DNA/ $\mu\text{g}$  OMV protein afterwards. This result confirmed that most DNA was inside the vesicles and not surface associated, since approximately 85% remained after DNase treatment.

To further characterize OMVs from *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> and verify that DNA was within the vesicles rather than surface associated in a DNase-resistant manner, we performed immunogold labeling of OMVs with an antibody specific for double-stranded DNA. Isolated OMVs from exponentially growing cultures were first treated with DNase before cryoimmobilization and freeze-substitution (HPF-FS) to eliminate DNA present outside the vesicles, and then the DNA gold-immunolabeling technique was applied to thin sections of OMVs. TEM observations of Lowicryl HM20 thin sections of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> OMVs also showed the presence of both types: (i) conventional or single-bilayer OMVs that were rarely marked with gold and contained non-electron-dense material (Fig. 3A) and (ii) OMVs with two bilayer membranes (Fig. 3B). The latter showed an external bilayer membrane that corresponded to the cell OM and an inner membrane also showing a bilayer structure that corresponded to the cell PM, as depicted in Fig. 1. These double-bilayer vesicles were filled with an electron-dense material, and most of them exhibited a highly visible gold mark (Fig. 3B). As expected, the gold marker was not seen outside the vesicles due to previous DNase treatment of OMVs before high-pressure freezing (Fig. 3A and B). To check that gold immunolabeling was specific, we performed several control experiments. First, sections were treated only with the secondary antibody, and no gold marking was observed (Fig. 3C). Second, we used a primary IgM antibody with no affinity for DNA and found that double-bilayer OMVs had no gold mark at all (Fig. 3D). Finally, when grids with sections were preincubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 6 h with 1 mg/ml DNase and then immunolabeled with the anti-DNA antibody, gold markers were not detected, showing that the DNA within double-bilayer vesicles was degraded by DNase treatment (Fig. 3E).

To identify protein components of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>-derived OMVs and determine their subcellular localization, we used a proteomic approach with 1-D SDS-PAGE and nano-LC-MS/MS analysis. For the proteomic analysis, isolated OMVs were further

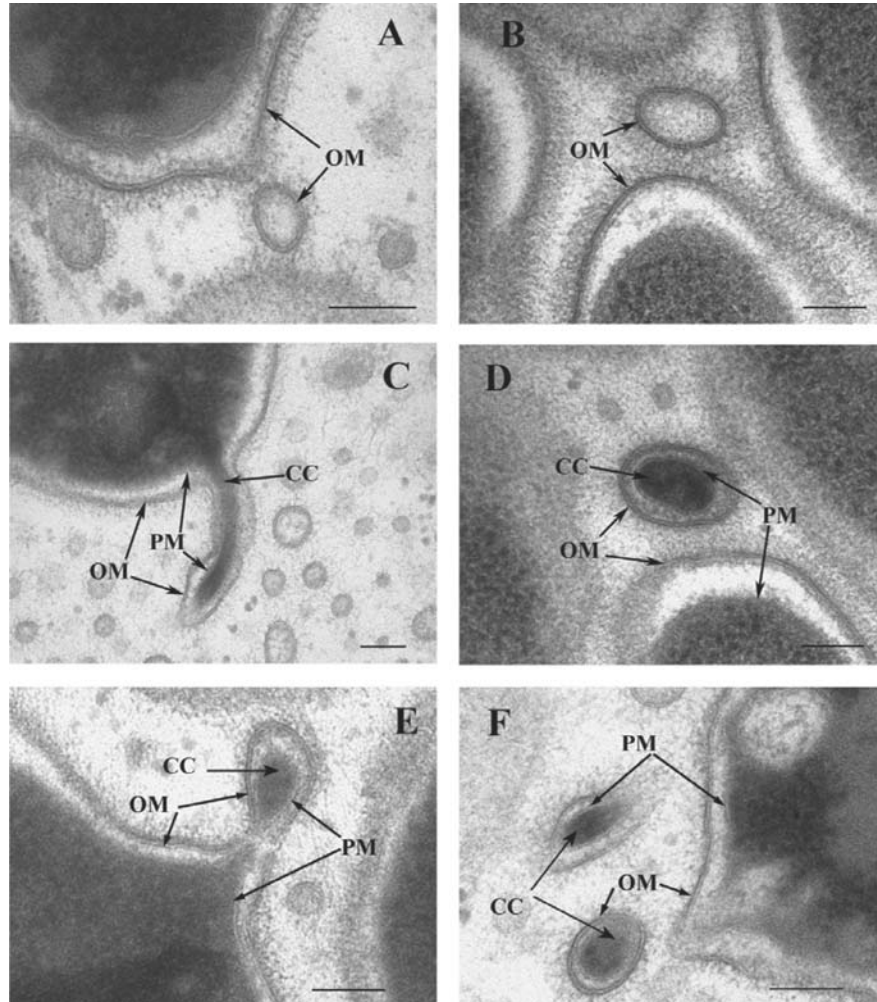


FIG 1 TEM micrographs of ultrathin sections from *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> prepared by HPF-FS. (A and B) A view of OMVs extruded from cells. Only one bilayer is observed around the vesicles, with the same structure as the outer membrane (OM) of the cell (arrows). (C) OMVs being released from cells and dragging the plasma membrane (PM) and a portion of the cytoplasmic content (CC) in addition to the OM. (D) The same type of vesicle observed in panel C but once outside the cell. (E and F) More views of OMVs that on release have incorporated CC surrounded by the PM. Bars, 100 nm (A, C, E) and 200 nm (B, D, F).

purified on an OptiPrep density gradient to remove contaminants. The protein profile and negative staining of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> purified OMVs are shown in Fig. 4. In Fig. 4B, we can see a double-bilayer OMV, but as OMVs can collapse on negative staining, this is not a good technique for a clear analysis of structural details. Protein bands (Fig. 4A) were excised from the gel and digested with trypsin. Peptides were separated by liquid chromatography and subsequently analyzed using a nano-ESI-QTOF mass spectrometer. Data were submitted for database searching in a MASCOT server and were searched against the NCBI nonredundant protein sequence database. The subcellular localization of proteins was analyzed using the PSORTb v3.0.2 program (24). The genome sequence for this bacterium is not available, and pro-

teins were putatively identified by their similarity to proteins from related species. Only 46 proteins were identified despite achievement of good mass spectra with more peptides, which was probably due to the significant differences between the protein sequence of this species and those of its counterparts in the database. The putative functions and subcellular localization of the proteins identified in OMVs from *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> are summarized in Table S1 in the supplemental material. As expected, the identified vesicular proteins were mainly from the outer membrane (OM) (69.57%), with most of them being TonB-dependent receptors and porins involved in inorganic ion transport and metabolism. The two prominent bands observed in 1-D SDS-polyacrylamide gels belonged to this category (Fig. 4A, see arrows), with the first

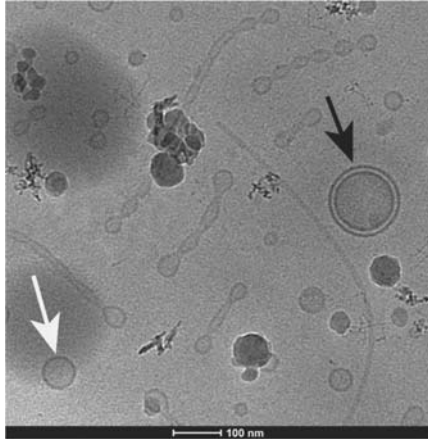


FIG 2 Isolated OMVs from *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> observed by cryo-TEM. Two types of OMVs can be seen. Most vesicles have a single membrane (white arrow), but occasionally vesicles with two membranes are observed (black arrow). Bar, 100 nm.

one corresponding to a TonB-dependent receptor (first protein listed in Table S1 in the supplemental material), while the second band included more than one protein, also mostly from the family of TonB-dependent receptors (proteins from rows 2 to 7 in Table S1 in the supplemental material). The few periplasm proteins identified (P) (4.35%) were mainly proteases. Another peptidase was localized as extracellular protein (EC) (2.2%). The proteomic study also identified the presence within *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>-derived OMVs of cytoplasmic membrane proteins such as cytochrome *c* oxidase and nucleoside transporters (CM) (6.5%) and cytoplasmic proteins such as F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase and Na<sup>+</sup>-translocating NADH-quinone reductase (C) (4.3%). The subcellular localization of some proteins, mainly hypothetical, was unknown (U) (13%).

## DISCUSSION

Numerous studies, particularly on pathogenic bacteria, have shown that OMVs can contain DNA and, in some cases, transfer it to other bacteria (9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19). The discovery that OMVs can function as a lateral DNA transfer mechanism in bacteria has important implications. The mechanism is a plausible one, since vesicles can protect DNA from degradation outside the cell and also favor DNA transmission between bacteria by association with cell envelopes (9, 19). Despite the great interest generated by the presence of DNA in bacterial OMVs, the mechanisms by which DNA is internalized in these vesicles are still not clear (1, 4, 8, 9, 16).

*Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> is an Antarctic psychrotolerant Gram-negative bacterium isolated by our research group from marine sediments collected on Deception Island (South Shetland Islands) (25). This strain can grow at temperatures ranging from -4°C to 34°C, and one of its prominent traits is an ability to produce a huge amount of natural OMVs from solid or liquid cultures without any inducing factors such as the addition of membrane-perturbing agents. Consequently, *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> is an excellent bacterium for exploring the vesiculation process.

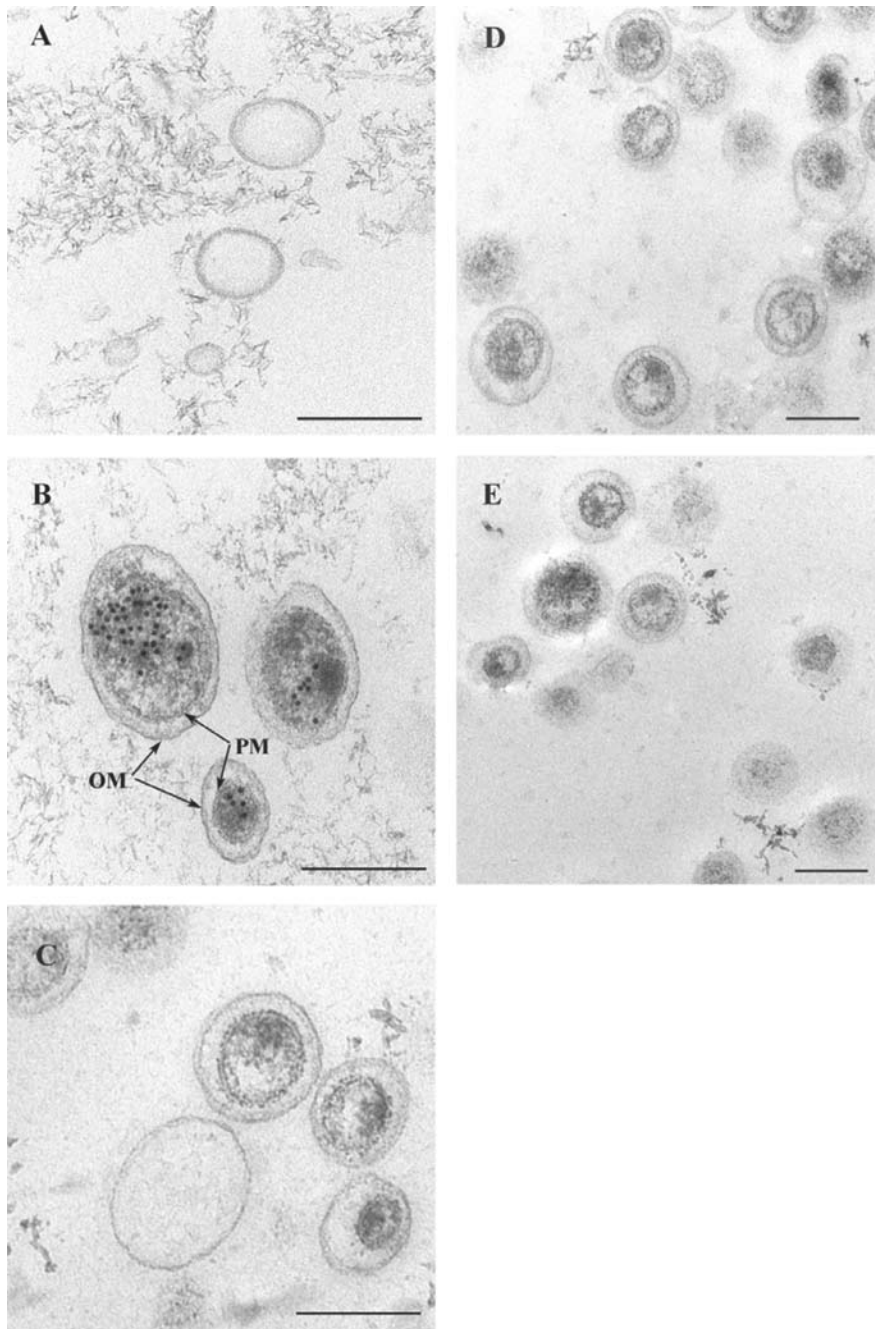
Structural analysis of the strain by TEM gave us an insight into a possible mechanism that would explain the presence of DNA inside OMVs from a Gram-negative bacterium. What drew our attention was that among the large number of single-bilayer OMVs produced by the *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> cells, we could see a different type of vesicle surrounded by a double bilayer and containing electron-dense material. We were able to repeatedly visualize this new type of double-bilayer OMV by TEM after HPF-FS in many thin sections of cells of this strain.

It was first necessary to rule out that these new vesicles were artifacts of the microscopic technique. Sample cryoimmobilization by rapid cooling and freeze-substitution is an accepted approach to visualizing samples very close to the native structure (21) and is also one of the best methods for preserving structure under conditions compatible with immunogold labeling (22). Some shrinkage of the specimen is often inevitable and modifications at the molecular level can occur, but what cannot be attributed to the technique is the appearance of vesicles, either with one or with two bilayers. It was particularly remarkable that for some *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> cells, both types of vesicles were captured at the very moment they were protruding from the cells. Even for the conventional OMVs described to date, it has proved extremely difficult to visualize vesicles at this stage of formation, and practically no quality images are available in the numerous published reports (8, 15, 20, 28). These double-bilayer vesicles were repeatedly observed in sections of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> cells grown on solid media and among vesicles harvested from liquid cultures in the exponential growth phase. Moreover, double-bilayer vesicles isolated from liquid media were also observed using the cryo-TEM technique, in which the specimen was undoubtedly “native” and free of chemical artifacts. The reliable images produced by state-of-the-art TEM techniques allowed us to confirm that *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> produces both single-bilayer and double-bilayer OMVs.

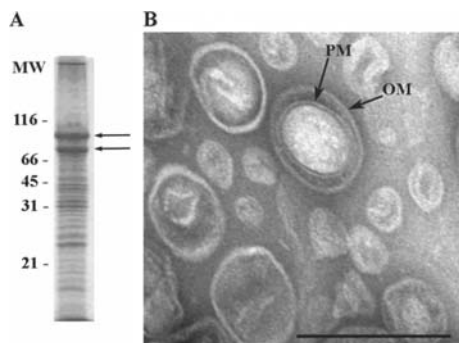
The images we obtained of double-bilayer OMVs of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> corroborate one of the models proposed by Kadurugamuwa and Beveridge (4) to explain how certain macromolecules in *Pseudomonas aeruginosa*, such as cytoplasmic enzymes and DNA, are exported via membrane vesicles. These authors proposed that a transient breach in the peptidoglycan during OMV development leads to the formation of vesicles that contain both inner and outer membranes as well as cytoplasmic constituents such as DNA. Indeed, micrographs produced in the current study match the model proposed by Kadurugamuwa and Beveridge (Fig. 5). The mechanism of formation of what they call “complicated” membrane vesicles containing cytoplasmic content implies a localized and transient action of autolysins that weakens the peptidoglycan layer just at the point where OMVs are blebbing. Therefore, the formation of these vesicles supposes an overproduction of peptidoglycan hydrolases, and the authors proved that *P. aeruginosa*-derived OMVs were enriched with hydrolyzing enzymes, providing vesicles with a lytic activity against other bacteria. Similarly, OMVs of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> induced cell lysis when brought into contact with several Gram-positive Antarctic bacteria, suggesting the presence of hydrolytic enzymes (data not shown).

*P. aeruginosa*-derived OMVs with cytoplasmic content that were overproduced after gentamicin treatment were larger than conventional OMVs (4). Although OMV size is generally accepted to be highly variable (20 to 250 nm) (1, 21), we observed that double-bilayer vesicles of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> were also larger than





**FIG 3** DNA immunolabeling on Lowicryl HM20 thin sections of isolated OMVs from *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>. (A) TEM micrograph showing single-bilayer OMVs immunolabeled with a monoclonal IgM specific against dsDNA and a secondary goat anti-mouse antibody coupled to 12-nm colloidal gold. No gold mark or electron-dense material is observed inside these vesicles. (B) TEM micrograph showing double-bilayer OMVs immunolabeled like the vesicles in panel A. The outer layer corresponds to the outer membrane of the cell (OM) and the inner layer to the plasma membrane of the cell (PM). Vesicles are filled with an electron-dense material, and gold mark is visualized inside the inner layer. (C) TEM micrograph of OMVs labeled only with the secondary antibody. Single- and double-bilayer OMVs are visualized with no gold mark at all. (D) TEM micrograph of OMVs labeled with a primary IgM monoclonal antibody to *Plasmodium falciparum* with no affinity to DNA and a secondary antibody coupled to 12-nm colloidal gold. No gold mark is observed. (E) TEM micrograph of OMVs from grids preincubated with 1 mg/ml DNase I and then immunolabeled with a dsDNA IgM and a secondary antibody coupled to gold. No gold mark is observed. Bars, 200 nm.



**FIG 4** (A) Protein profile of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> purified OMVs using 12.5% 1-D SDS-PAGE. Numbers on the left correspond to molecular weight (MW) in thousands. Arrows indicate the two prominent bands detected. (B) Negative-staining micrograph from purified *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> OMVs. A double-bilayer vesicle can be observed with an inner layer that corresponds to the plasma membrane (PM) and an outer layer corresponding to the outer membrane (OM). Bar, 50 nm.

single-bilayer vesicles, with diameters commonly ranging from 100 to 250 nm, which suggests that the two types of OMVs undergo different formation processes.

Of all the OMVs observed in *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>, 0.1% were quantified by cryo-TEM as double bilayers, which seems reasonable accurate, since a higher proportion could compromise cell viability. We should take into account that the formation of these double-bilayer vesicles implies a perturbation of the integrity of the peptidoglycan layer, resulting in the loss of both cytoplasmic membrane and content, which could also lead to cell death. This proportion was estimated among vesicles retrieved from exponentially growing cultures to avoid cell lysis, which could generate membrane fragments of bacterial envelopes that reseal in solution. We should also point out that no opened vesicles were observed in the cryo-TEM analysis of OMVs from *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>. In future studies it will be interesting to determine if the proportion of double-bilayer OMVs from *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> depends on the growth phase and growth conditions for this strain.

The proteomic study of OMVs from *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> also confirmed the presence of proteins and enzymes from the plasma membrane and cytoplasm, thus corroborating that both inner membrane and cytoplasmic content were included in these new

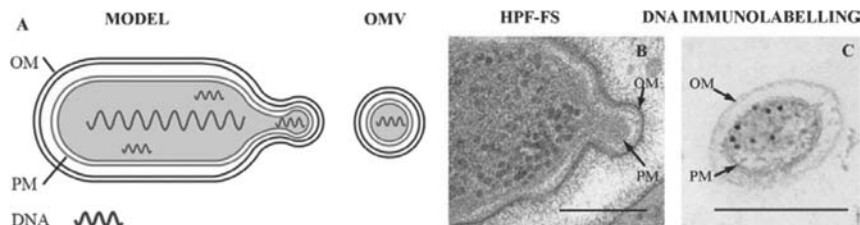
vesicles. Other accurate proteomic studies of OMVs from Gram-negative bacteria have also reported the presence of enzymes from the plasma membrane and cytoplasm but these studies have not clarified the mechanism involved (1, 6, 28, 29).

Fluorometric DNA detection confirmed that *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> is capable of exporting dsDNA inside vesicles. The DNA content of natural OMVs from this Antarctic strain was higher than values reported for those of *Pseudomonas aeruginosa* (16) and several strains of *Escherichia coli* O157:H7 (15). This can be explained by the particular ability of *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> to produce these double-layered OMVs with cytoplasmic content and the capacity of the strain to form a huge amount of vesicles in general. The amount of DNA within OMVs seems to be a variable parameter within the same bacterial strain and among different strains of the same bacterial species (15), and this variability was also detected in *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>.

The TEM immunolabeling technique with an antibody highly specific for dsDNA detection clearly demonstrated that the DNA quantified in *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>-derived OMVs was mostly packaged in double-layered vesicles. DNA content reported in OMVs from different Gram-negative bacteria has been quantified using other methods, but its presence inside the vesicles has never been visualized (4, 15, 16) before the present work.

The DNA detected in OMVs from *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> was small ( $\approx 600$  bp), and no plasmids from this strain were detected inside vesicles (data not shown). For the moment, it is difficult to propose a role for these double-bilayer OMVs from *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> or to demonstrate if they are involved in DNA transfer within the strain or between other related strains in the Antarctic environment, mainly because a genomic sequence of this strain is not available yet and no genes related to enzymes, virulence factors, or other proteins have been identified inside OMVs.

We can conclude that *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> naturally produces a previously undescribed type of OMV that contains not only the outer membrane of the cell but also its plasma membrane and cytoplasmic content, with the consequent ability to entrap DNA. We propose the name outer-inner membrane vesicle (O-IMV) for this new type of double-bilayer OMV. This finding is important because it corroborates a model proposed by Beveridge's group to explain how cytoplasmic components and DNA can be incorporated into OMVs before they are released from the cell. Future work will be directed to demonstrating the existence of this new type of double-bilayer vesicle in pathogenic bacteria for which DNA transfer through OMVs has been already reported.



**FIG 5** (A) Model proposed for the formation of new O-IMVs in Gram-negative bacteria and packaging of DNA. Plasma membrane and cytoplasmic content are included in the vesicle that is leaving the cell, and DNA can thus be incorporated. (B) TEM micrograph of an *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> cell supporting the model in panel A. (C) TEM micrograph showing an isolated double-bilayer vesicle from this strain after immunolabeling with a dsDNA antibody. OM, outer membrane; PM, plasma membrane; OMV, outer membrane vesicle; HPP-FS, high-pressure freezing and freeze-substitution. Bars, 200 nm.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Government of Spain (CICYT project CTQ 2010-21183-C02-01/PPQ) and by the Autonomous Government of Catalonia (grant 2009SGR1212). Carla Pérez-Cruz is the recipient of fellowship FFAR2012.3 from the University of Barcelona. Ornella Carrión is the recipient of fellowship BES-2011-044048.

## REFERENCES

- Kulp A, Kuehn MJ. 2010. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 64:163–184.
- Ellis TN, Kuehn MJ. 2010. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74:81–94.
- Horstman AL, Kuehn MJ. 2000. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 275:12489–12496.
- Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. 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. *J. Bacteriol.* 177:3998–4008.
- Kesty NC, Mason KM, Reedy M, Miller SE, Kuehn MJ. 2004. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J.* 23:4538–4549.
- Lee EY, Choi DS, Kwang-Pyo K, Yong SG. 2008. Proteomics in Gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom. Rev.* 27:535–555.
- Li Z, Clarke AJ, Beveridge TJ. 1998. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J. Bacteriol.* 180:5478–5483.
- Mashburn-Warren L, Mclean RJC, Whiteley M. 2008. Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. *Geobiology* 6:214–219.
- Mashburn-Warren LM, Whiteley M. 2006. Special delivery: vesicles trafficking in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 61:839–846.
- Schooling SR, Hubley A, Beveridge TJ. 2009. Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 191:4097–4102.
- Dorward DW, Garon CF. 1990. DNA is packaged within membrane-derived vesicles of gram-negative but not gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1960–1962.
- Dorward DW, Garon CF, Judd RC. 1989. Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 171:2499–2505.
- Kahn ME, Barny F, Hamilton OS. 1983. Transformosomes: specialized membranous structures that protect DNA during *Haemophilus* transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:6927–6931.
- Kahn ME, Maul G, Goodgal SH. 1982. Possible mechanism for donor DNA binding and transport in *Haemophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79:6370–6374.
- Kolling GL, Matthews KR. 1999. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1843–1848.
- Renelli M, Matias V, Lo RY, Beveridge TJ. 2004. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* 150:2161–2169.
- Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3084–3090.
- Tashiro Y, Uchiyama H, Nomura N. 21 November 2011. Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02632.x.
- Yaron S, Kolling GL, Beveridge TJ. 2000. Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4414–4420.
- Deatherage BL, Lara JC, Bergsbaken T, Rassoulouli-Barrett SL, Lara S, Cookson BT. 2009. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* 72:1395–1407.
- Beveridge TJ. 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 181:4725–4733.
- Bleck CKE, Merz A, Gutierrez MG, Walther P, Dubochet J, Zuber B, Griffiths G. 2010. Comparison of different methods for thin section EM analysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Microsc.* 237:23–38.
- Frias A, Manresa A, de Oliveira E, Lopez-Iglesias C, Mercadé E. 2010. Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted Antarctic bacteria. *Microb. Ecol.* 59:476–486.
- Nevot M, Deroncelé V, Messner P, Guinea J, Mercadé E. 2006. Characterization of outer membrane vesicles released by the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF3. *Environ. Microbiol.* 8:1523–1533.
- Bozal N, Montes MJ, Miñana-Galbis D, Manresa A, Mercadé E. 2009. *Shewanella vesiculosa* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from an Antarctic coastal area. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:336–340.
- McBroom AJ, Johnson AP, Vemulapalli S, Kuehn MJ. 2006. Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J. Bacteriol.* 188:5385–5392.
- Yu NY, Wagner MR, Laird G, Mellis G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M, Foster LJ, Brinkman FSL. 2010. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization sub-categories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26:1608–1615.
- Lee EY, Bang JY, Park GW, Choi DS, Kang JS, Kim HJ, Park KS, Lee JO, Kim YK, Kwon KH, Kim KP, Cho YS. 2007. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics* 7:314–353.
- Kwon S, Cho YS, Lee JC, Kim SI. 2009. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* 297:150–156.

RESEARCH ARTICLE

# Outer-Inner Membrane Vesicles Naturally Secreted by Gram-Negative Pathogenic Bacteria

Carla Pérez-Cruz<sup>1</sup>, Lidia Delgado<sup>2</sup>, Carmen López-Iglesias<sup>2</sup>, Elena Mercade<sup>1\*</sup>

**1** Laboratori de Microbiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Crio-Microscòpia Electrònica, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

\* [mmercade@ub.edu](mailto:mmercade@ub.edu)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Pérez-Cruz C, Delgado L, López-Iglesias C, Mercade E (2015) Outer-Inner Membrane Vesicles Naturally Secreted by Gram-Negative Pathogenic Bacteria. PLoS ONE 10(1): e0116896. doi:10.1371/journal.pone.0116896

**Academic Editor:** Thomas Rudel, University of Würzburg, GERMANY

**Received:** July 25, 2014

**Accepted:** December 16, 2014

**Published:** January 12, 2015

**Copyright:** © 2015 Pérez-Cruz et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work received funding from the following sources: Government of Spain (CICYT grant CTQ 2010-21183-C02-01/PPQ)EM CP-C, Autonomous Government of Catalonia (grant 2009SGR1212)EM CL-I, and Fellowship FFAR2012.3 from the University of Barcelona (CP-C). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Outer-inner membrane vesicles (O-IMVs) were recently described as a new type of membrane vesicle secreted by the Antarctic bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T. Their formation is characterized by the protrusion of both outer and plasma membranes, which pulls cytoplasmic components into the vesicles. To demonstrate that this is not a singular phenomenon in a bacterium occurring in an extreme environment, the identification of O-IMVs in pathogenic bacteria was undertaken. With this aim, a structural study by Transmission Electron Microscopy (TEM) and Cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM) was carried out, confirming that O-IMVs are also secreted by Gram-negative pathogenic bacteria such as *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Acinetobacter baumannii* AB41, in which they represent between 0.23% and 1.2% of total vesicles produced. DNA and ATP, which are components solely found in the cell cytoplasm, were identified within membrane vesicles of these strains. The presence of DNA inside the O-IMVs produced by *N. gonorrhoeae* was confirmed by gold DNA immunolabeling with a specific monoclonal IgM against double-stranded DNA. A proteomic analysis of *N. gonorrhoeae*-derived membrane vesicles identified proteins from the cytoplasm and plasma membrane. This confirmation of O-IMV extends the hitherto uniform definition of membrane vesicles in Gram-negative bacteria and explains the presence of components in membrane vesicles such as DNA, cytoplasmic and inner membrane proteins, as well as ATP, detected for the first time. The production of these O-IMVs by pathogenic Gram-negative bacteria opens up new areas of study related to their involvement in lateral gene transfer, the transfer of cytoplasmic proteins, as well as the functionality and role of ATP detected in these new vesicles.

## Introduction

Membrane vesicles (MVs) are part of a secretion-delivery system used by many Gram-negative bacteria, which allows the long-distance dissemination of bacterial products into the

environment and promotes interaction with other cells, thus eliminating the need for bacterial contact. They are particularly involved in inter-kingdom communication, nutrient acquisition, maintenance of the biofilm structure, predation and horizontal gene transfer [1]. Furthermore, MVs from pathogenic bacteria are secreted to deliver toxic compounds directly into the host cells, enhance bacterial survival in a hostile environment and modulate host immune response. They are enriched in virulence factors such as LPS, invasins, adhesins, immunomodulatory compounds and lytic enzymes [2–4]. Vesicles also allow interaction between prokaryotic cells. Most bacteria package antimicrobial factors into MVs, such as peptidoglycan hydrolases that cause the lysis of Gram-negative and Gram-positive bacteria, consequently killing competitors [5].

MVs are commonly described as spherical bilayered structures with an average diameter between 20 and 250 nm, produced when a small portion of the outer membrane (OM) bulges away from the cell and entraps periplasmic content. Therefore, MVs are mainly composed by LPS, periplasmic proteins, outer membrane proteins and phospholipids [6]. However, biochemical and proteomic studies have also repeatedly noticed the presence of components from the plasma membrane and cytoplasm [7]; indeed, some authors have proposed that they are constitutional components of MVs [8]. The presence of such components has been reported in many proteomic studies of pathogenic bacteria such as *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Francisella novicida* and *Neisseria meningitidis* [8–15]. Another proteomic study performed by Lee and co-workers on *Escherichia coli* also detected cytoplasmic proteins in MVs but not some of the most abundant proteins in the bacterial cell cytoplasm, suggesting the involvement of a specific sorting mechanism [16]. Also, when the enzymatic marker for plasma membrane NADH oxidase was assayed in MVs from *P. aeruginosa*, its activity was detected [17].

Cytoplasmic components other than proteins are also found in MVs. The presence of DNA has been reported in vesicles from *Haemophilus influenzae*, *Yersinia pestis*, and *Shigella flexneri* [13], [18]. The DNA detected within MVs originates from multiple sources, including chromosomal DNA, plasmid DNA and DNA from bacteriophage [19]. Furthermore, MVs mediate the transfer of virulence genes between *E. coli* and other enteric bacteria. Antimicrobial resistance genes can also be exported via MVs, as described for *N. gonorrhoeae* and *A. baumannii* [20], [21]. This has led to the suggestion that vesicles may be involved in the exchange of genetic material among similar bacterial species and might represent a fourth method of lateral gene transfer [19]. Despite the importance of gene transfer in pathogenic bacteria via MVs, the mechanism of DNA encapsulation remains unclear [5].

In previous work, we demonstrated by TEM and Cryo-TEM that the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> naturally produces a new type of outer membrane vesicle, which can entrap cytoplasmic content through a protrusion of the outer and plasma membranes. A proteomic study of MVs from this strain detected the presence of cytoplasm and plasma membrane proteins. Moreover, DNA immunogold labeling of ultrathin sections of these double-bilayered MVs showed that DNA was packaged inside, which proved that cytoplasmic content was being delivered by MV formation. These previously undescribed bacterial structures, which represent a new model of vesiculation, were termed “outer-inner membrane vesicles” (O-IMVs) [22].

The aim of the current study was to determine whether these new O-IMVs are exclusive to the Antarctic bacteria *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup>, or are also secreted by pathogenic Gram-negative bacteria whose MVs have been repeatedly reported to contain cytoplasmic components and DNA. For this purpose, three pathogenic bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Acinetobacter baumannii* AB41 and *Neisseria gonorrhoeae* DSM15130 and their derived MVs were analyzed by TEM and Cryo-TEM, and the presence of cytoplasmic constituents such as DNA, proteins or ATP was also evaluated.

## Material and Methods

### Bacterial strains and growth conditions

*Neisseria gonorrhoeae* DMS 15130, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and the clinical isolate *Acinetobacter baumannii* AB41 were employed for this study. The clinical isolate *A. baumannii* AB41 was kindly provided by Dr. Jordi Vila from the University of Barcelona. Unless otherwise stated, for TEM studies, *Pseudomonas* PAO1 was grown in Trypticase soy agar (TSA, Oxoid) and *A. baumannii* in Columbia blood agar (Oxoid), and both were incubated at 37°C for 18h, while *N. gonorrhoeae* was grown in chocolate agar (CHOC, Oxoid) at 37°C for 48h. For membrane vesicle isolation, *Pseudomonas* PAO1 was grown in Trypticase soy broth (TSB, Oxoid) at 37°C for 5 hours, *A. baumannii* AB41 in Müller-Hinton broth (MH, Oxoid) at 30°C for 15h, and both liquid cultures were incubated in an orbital shaker at 100 rpm. Membrane vesicles from *N. gonorrhoeae* were retrieved from confluent cultures grown in chocolate agar plates (CHOC) for 65h at 37°C.

### MV Isolation and purification from culture media

*A. baumannii* AB41 and *Pseudomonas* PAO1 naturally secrete MVs into media. MVs from both strains were collected from broth cultures (500 ml) in the late log phase using an adaptation of the method described by McBroom and coworkers [23]. The cells were pelleted by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 10 min at 4°C, and the supernatant was filtered through 0.45- $\mu\text{m}$ -pore-size filters to remove remaining bacterial cells. MVs were obtained by centrifugation at  $40,000 \times g$  for 1 h at 4°C in an Avanti J-20 XP centrifuge (Beckman Coulter, Inc.). Pelleted vesicles were resuspended in 50 ml of 50 mM HEPES pH 6.8 (Sigma) and filtered through 0.22- $\mu\text{m}$ -pore-size Ultrafree spin filters (Millipore). Vesicles were again pelleted and finally resuspended in an adequate volume of 50 mM HEPES, pH 6.8 (Sigma). MVs from *N. gonorrhoeae* were collected from confluent solid cultures grown on CHOC plates. Cells and MVs from 20 agar plates were resuspended in 15 ml of Ringer ¼ (Sigma) per plate and from this moment the MVs were obtained as described for liquid media cultures.

For proteomic studies, MVs from *N. gonorrhoeae* were further purified by ultracentrifugation in OptiPrep gradients as described by Pérez-Cruz et al. [22].

### TEM observation after High-Pressure Freezing and Freeze Substitution (HPF-FS)

TEM observations of the three strains and their isolated MVs were performed as described by Pérez-Cruz et al [22]. Briefly, bacterial colonies were cryoimmobilized using a Leica EMPact high-pressure freezer (Leica, Vienna, Austria). Frozen samples were freeze-substituted in a Leica EM automatic freeze substitution (AFS) system (Leica, Vienna, Austria), where the substitution was performed in pure acetone containing 2% (wt/vol) osmium tetroxide and 0.1% (wt/vol) uranyl acetate at -90°C for 72 h. The temperature was gradually increased (5°C/h) to 4°C, held constant for 2 h, and then finally increased to room temperature and maintained for 1 h. Samples were washed for 1 h in acetone at room temperature and infiltrated in a graded series of Epon-acetone mixtures, and pure Epon 812 (Ted Pella, Inc.) for 30 h. Samples were embedded in fresh Epon and polymerized at 60°C for 48 h. Epon-embedded thin sections were examined in a Tecnai Spirit electron microscope (FEI Company, Netherlands) at an acceleration voltage of 120 kV.

### Cryo-TEM observation of pathogenic bacteria cultures and their isolated MVs

Bacterial suspensions containing MVs from *N. gonorrhoeae*, *Pseudomonas* PAO1 and *A. baumannii* AB41 were visualized by Cryo-TEM. *Pseudomonas* PAO1 and *A. baumannii* AB41

were incubated overnight in 50 mL of TSB medium. For *N. gonorrhoeae*, confluent CHOC agar cultures were incubated for 24 hours and resuspended in 50 ml in PBS. For all strains, a large part of the cells were gently removed by centrifugation at 3,000 x g for 10 minutes. The remaining cells and MVs from each strain were sedimented from the supernatants by high-speed centrifugation at 40,000 x g for 30 minutes in an Avanti J-20 XP centrifuge (Beckman Coulter, Inc). The pellet was washed with 50 ml of 50 mM HEPES pH 6.8 and centrifuged again at 40,000 x g. Finally, the pellet was resuspended in an adequate volume of 50 mM HEPES pH 6.8 for Cryo-TEM observation. For that purpose, the suspension was adjusted to a turbidity equivalent to 1 McFarland standard. For Cryo-TEM observation of isolated MVs without cells, samples were prepared as described in the above method for MV Isolation and purification from culture media. In all Cryo-TEM analysis, five microliters of the corresponding suspension were applied on freshly glow-discharged Quantifoil R 2/2 grids (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Germany). The sample was allowed to adhere to the grids for 1 minute. The excess of liquid was then blotted with filter paper, leaving the sample films spanning the grid holes. The samples were vitrified by plunging the grid into ethane, which was kept at melting point with nitrogen using a Vitroblot (FEI Company, Eindhoven, Netherlands), and maintained before freezing at 100% humidity and room temperature. The vitreous sample films were transferred to a Tecnai F20 microscope (FEI Company, Eindhoven, Netherlands), using a Gatan cryotransfer system (Gatan Inc. Pleasanton, CA). Cryo-TEM visualizations were carried out at a temperature between  $-170^{\circ}\text{C}$  and  $-175^{\circ}\text{C}$  and at the accelerating voltage of 200kV. Images were acquired using low-dose imaging conditions and an Eagle 4k x 4k Images charged-coupled device (CCD) camera (FEI Company, Eindhoven, Netherlands). The different type of vesicles and the diameters were analyzed using Image J software [24]. Each experiment was performed in duplicate.

### Proteomic analysis of MVs from *N. gonorrhoeae*

A proteomic analysis of purified MVs from *N. gonorrhoeae* was carried out using one-dimensional (1-D) SDS-PAGE and nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis as described by Pérez-Cruz et al. with some modifications [22]. Briefly, proteins were in-gel digested with trypsin, and the tryptic peptides were extracted from the gel matrix, pooled, and dried in a vacuum centrifuge. The dried-down peptide mixture was analyzed in a nanoAcquity liquid chromatographer (Waters) coupled to an LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) mass spectrometer. A database was created merging all Uniprot-SwissProt and Uniprot-TrEMBL entries for *Neisseria gonorrhoeae* with Uniprot-Swissprot all (September 2013). The software Thermo Proteome Discover (v.1.3.0.339) was used to perform a search by the Sequest search engine against this database. The results were filtered and only proteins identified with at least 2 high confidence peptides ( $\text{FDR} \leq 0.01$ ) were included. Bacterial protein subcellular localization was predicted with the software PSORTb v3.0.2 [25].

### Fluorometric DNA quantification

Surface-associated DNA and DNA contained within MVs were quantified by the PicoGreen assay (Molecular Probes) as described by Pérez-Cruz et al. [22]. MVs were collected from three independent experiments. For each experiment, two 30- $\mu\text{g}$  protein samples from MVs were prepared. One was pretreated with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pancreatic DNase I (Sigma) and 10mM  $\text{MgCl}_2$  (1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ ) to digest DNA located outside the OMVs. Both MVs samples were lysed with 0.125% Triton X-100 solution. Samples were further processed according to the manufacturer's instructions, and fluorescence was measured in a Modulus Microplate Multimode Reader

(Turner Biosystems). Each experiment was performed in triplicate and the results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

### DNA Immunolabeling of MVs from *N. gonorrhoeae* thin sections

HPF-FS of isolated MVs from *N. gonorrhoeae* was carried out as described previously by Pérez-Cruz et al. [22]. Colloidal gold immunolabeling of Lowicryl-HM20 thin sections was carried out as follows. Grids were pre-treated with a solution of 100  $\mu$ g/ml proteinase K (Sigma) to expose the DNA before the immunolabeling. Unless specified, washing steps were carried out by floating the grids face down on the drops. Grids with sections were floated on 0.1 M PBS for 3 min. The grids were blocked on 0.1 M PBS–50 mM glycine and rinsed with 0.1 M PBS, again with 2.5% BSA–0.1 M PBS (1 drop for 3 min and 1 drop for 12 min), and again with 1% BSA–0.1 M PBS (1 drop for 8 s). Next, the grids were incubated with monoclonal IgM specific for double-stranded DNA (dsDNA) (clone AC-30–10; Novus Biologicals), diluted 1/2 in 0.1% BSA–0.1 M PBS, for 1 h. Grids were washed for 5 min on 5 drops of 0.25% Tween 20–0.1 M PBS, followed by 3 min on 1 drop of 0.1% BSA–0.1 M PBS. After that, grids were incubated for 30 min with a secondary goat anti-mouse antibody coupled to 12-nm colloidal gold (lot 84359; Jackson) diluted 1/20 in 0.1% BSA–0.1 M PBS. Grids were washed with 0.1 M PBS, followed by double-distilled water and then floated on 1% glutaraldehyde–0.1 M PBS for 5 min. Grids were rinsed with double-distilled water and dried with filter paper. Finally, grids were post-stained with 2% uranyl acetate–methanol for 5 min, 70% methanol for 3 min, 50% methanol for 3 min, and 30% methanol for 3 min, jet-washed with double-distilled water, air dried for 20 min, stained with lead citrate for 2 min, and jet-washed with double-distilled water. Two controls were used. First, the dsDNA monoclonal antibody was omitted. Second, the grids were preincubated at 37°C for 16 h with 1 mg/ml DNase I (Sigma) in PBS plus 7 mM MgCl<sub>2</sub>, and then the grids were thoroughly washed with water before immunolabeling with the dsDNA monoclonal antibody.

### Luminescent quantification of ATP

ATP contained in MVs was measured by a BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay (Promega). Isolated MVs were retrieved from exponential growing cultures as described above and samples were stored at –80°C to avoid ATP degradation. Aliquots of each MV preparation from the three assayed strains were inoculated into the corresponding fresh culture media and incubated overnight at 37°C to check for bacterial contamination. 100  $\mu$ l of isolated MVs were processed according to the manufacturer's instructions and the luminescence was measured in Modulus Microplate Multimode Reader (Turner Biosystems). The standard curve was prepared from 1  $\mu$ M of Adenosine 5'-triphosphate sodium salt (Promega) initial solution and 10-fold serial dilutions were done (1  $\mu$ M to 10 pM). ATP concentrations in MV samples were determined by comparing the signal emitted with the ATP standard curve for each assay. The protein concentration of each sample was determined. Each experiment was performed in duplicate and the ATP content was normalized by protein concentration.

## Results

### TEM observation of O-IMVs in pathogenic bacteria after HPF-FS

We performed a structural analysis by TEM to determine if three pathogenic bacteria, *N. gonorrhoeae*, *Pseudomonas* PAO1 and *A. baumannii* AB41, were able to secrete different types of membrane vesicles in the same way as we had previously demonstrated in the non-pathogenic Antarctic bacteria *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> [22]. From now on, membrane vesicles



(MVs) will refer to all the vesicles isolated from one bacterium, outer membrane vesicles (OMVs) are the conventional single bilayered membrane vesicles, and finally, O-IMVs refer to the new double-bilayer membrane vesicles.

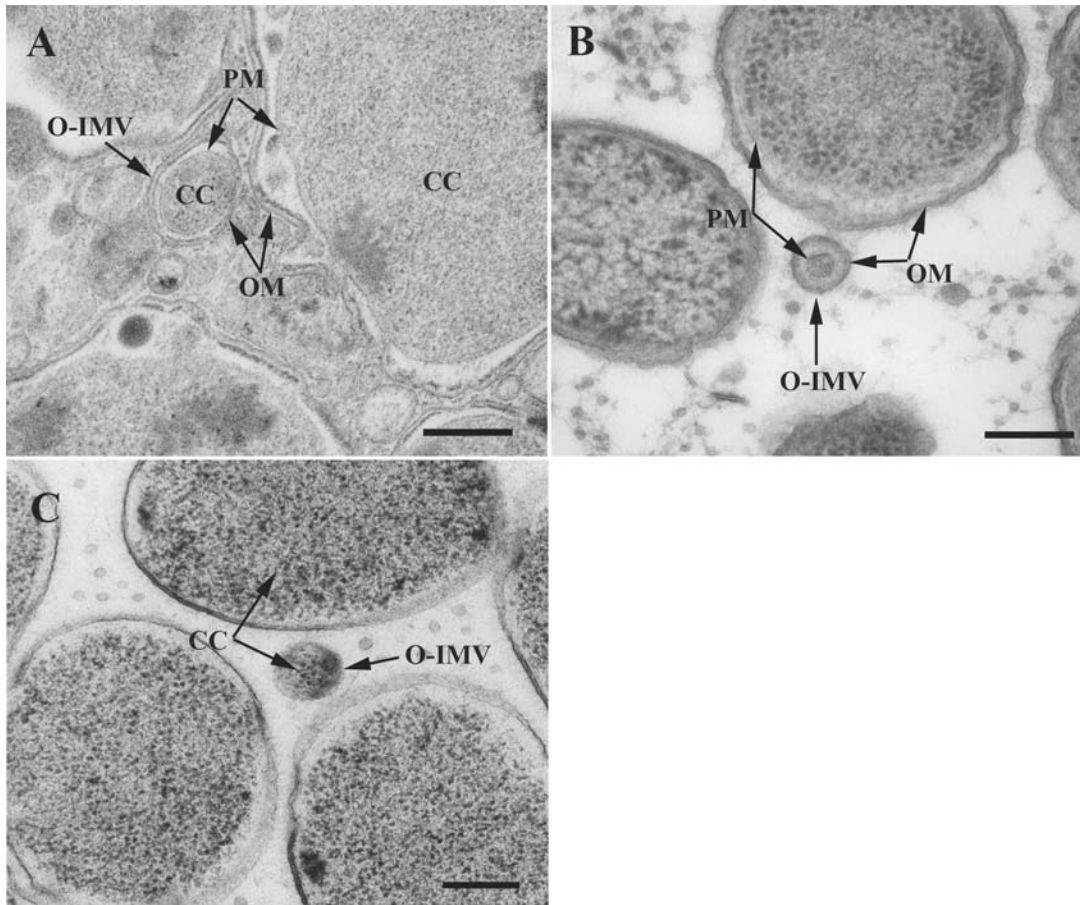
TEM observations of ultrathin sections of whole cells obtained from solid cultures after HPF-FS revealed extracellular matter containing large amounts of MVs. The conventional OMVs with a single bilayer were predominant, exhibiting the same structure, width, and staining profile as the outer cell membrane (OM). Less frequently, in sections from each of the three analyzed bacteria, O-IMVs with a double bilayer were also visualized (Fig. 1). Inside the inner membrane of the O-IMVs we observed a highly electron-dense material, similar to that seen in the cell cytoplasm, and small rough areas resembling cytoplasmic ribosomes. Furthermore, in *N. gonorrhoeae* we clearly observed an O-IMV precisely at the moment of formation (Fig. 2), which confirmed that the external membrane derived from the cell OM, and the inner membrane corresponded to the cell plasma membrane (PM). It should be stressed that these O-IMVs were naturally secreted without the presence of any disturbing factor (e.g. antibiotic, chelating agents or antibodies), and appeared to pinch off from cells that seemed otherwise undamaged and featured intact cell envelopes.

For the same purpose, MVs from the three strains grown on liquid cultures were isolated and analyzed by TEM after HPF-FS (Fig. 3). Although single-bilayer OMVs predominated in all observed fields, the new O-IMVs were detected in each of the three pathogenic bacteria, and presented a similar structure, which included a double bilayer surrounding highly electron-dense material.

### Cryo-TEM analysis of pathogenic bacteria and O-IMV observation

To confirm the existence of the new O-IMVs in the three analyzed pathogenic strains, accurate ultrastructural image data of the bacterial cells and their associated MVs was obtained by Cryo-TEM in a close-to-native state. Bacterial cell suspensions were obtained from exponentially growing cultures of *Pseudomonas* PAO1 and *A. baumannii*, and from confluent solid cultures of *N. gonorrhoeae*. The suspensions were subjected to gentle centrifugation to eliminate the majority of the cells. The clarified supernatants were then centrifuged at high speed to sediment the remaining cells and their MVs. The pellet was resuspended, vitrified and imaged by Cryo-TEM at  $-178^{\circ}\text{C}$  using the low-radiation-dose scheme.

The major features of the cell envelopes of the Gram-negative bacteria, *N. gonorrhoeae*, *Pseudomonas* PAO1 and *A. baumannii* AB41, were visualized by Cryo-TEM. Since plunge-frozen cells are not cryo-sectioned as in CEMOVIS but are observed whole, their thickness only allows a good resolution of the outer part of the cell. Outer and plasma membranes, separated by the periplasmic space in which the peptidoglycan layer was identifiable, were observed (Fig. 4A and B, black squares). The bilayer structure of the outer and plasma membranes was visualized in few cases. Cell membranes from the three strains had a smooth appearance, without any protuberances that might suggest vesiculation. Secreted MVs were observed in all preparations (Fig. 4). The conventional OMVs showed the typical single-layer structure and were filled with a low electron-dense material. In contrast, the new O-IMVs showed two layers with the same profile as the cell OM and PM, entrapping a highly electron-dense material similar to the cytoplasmic content of the cell (Fig. 4, white squares). The sample thickness of whole-mounted plunge-frozen cells (more than 500 nm) made it difficult to simultaneously focus both the cells and the small vesicles. This was especially the case for small conventional OMVs (about 20 nm), which were hardly observed despite their abundance. In all cryo-fixed samples, cells presented a well-preserved ultrastructure and no cellular remnants or signs of cellular stress and cell disintegration were visible.

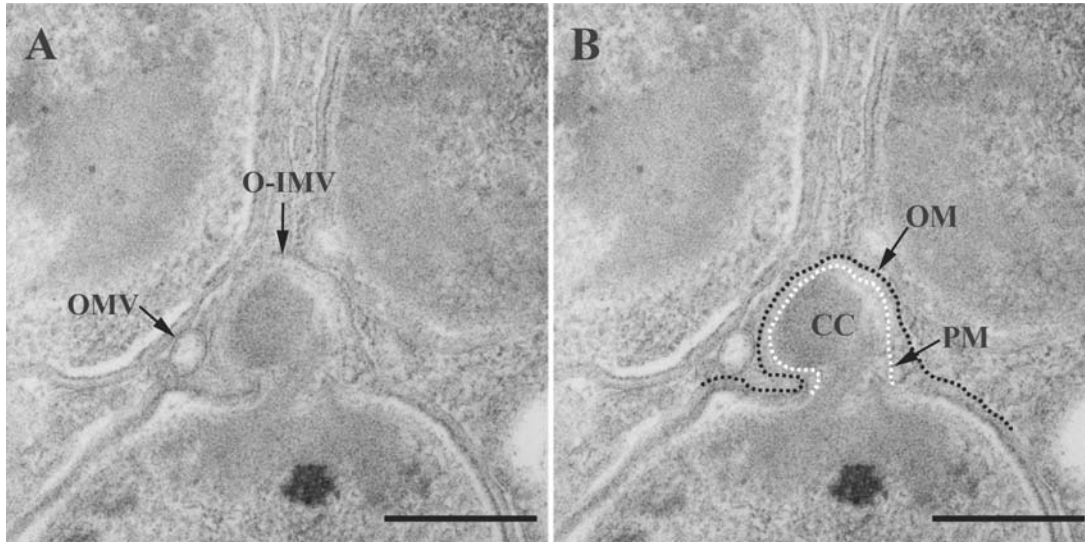


**Figure 1. MVs visualized by TEM in pathogenic bacteria.** HPF-FS sections correspond to the three pathogenic strains grown in solid media: (A) *N. gonorrhoeae*, (B) *Pseudomonas* PAO1 and (C) *A. baumannii*. O-IMVs (marked with arrows) are observed in the extracellular matter of the three pathogenic bacteria. O-IMVs in A and B clearly show a double bilayer, which exhibits the same staining profile as OM and PM from the respective cells. The O-IMV inner membrane encloses a material similar to that seen in the cytoplasm of the respective cells. OM: outer membrane; PM: plasma membrane; CC: cytoplasmic content. Bars 200 nm.

doi:10.1371/journal.pone.0116896.g001

### Quantification of O-IMVs from pathogenic strains by Cryo-TEM

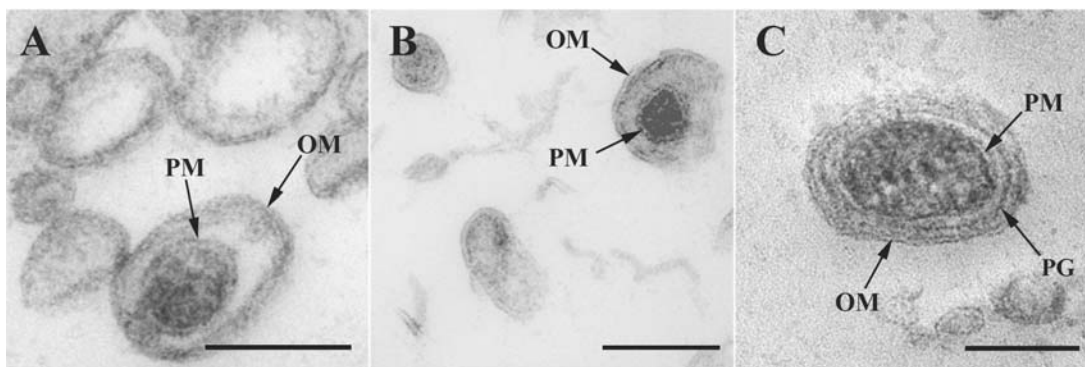
To determine the frequency at which O-IMVs were produced in different pathogenic strains, and to obtain accurate measurements of the diameters of each type of vesicle, we analyzed whole plunge-frozen MV samples by Cryo-TEM. MVs from *N. gonorrhoeae* were obtained from confluent cultures in solid agar, while *Pseudomonas* PAO1 and *A. baumannii* AB4 MVs were retrieved from exponentially growing cultures. The growth conditions assayed for all the strains were designed to avoid the presence of circularized membrane fragments from cell debris. The vesicles were obtained from cell-free supernatants according to a standard high-speed centrifugation protocol that ensures the recovery of even the smallest vesicles.



**Figure 2. An O-IMV being released from the surface of a *N. gonorrhoeae* cell.** (A) The TEM micrograph provides a view of an O-IMV at the moment of its formation, where the outer membrane (OM) is being extruded, dragging along the plasma membrane (PM) and a portion of the cytoplasmic content (CC). (B) The same image as A but with the cell envelope outlined to highlight the formation and structure of the O-IMV. Bars, 200 nm.

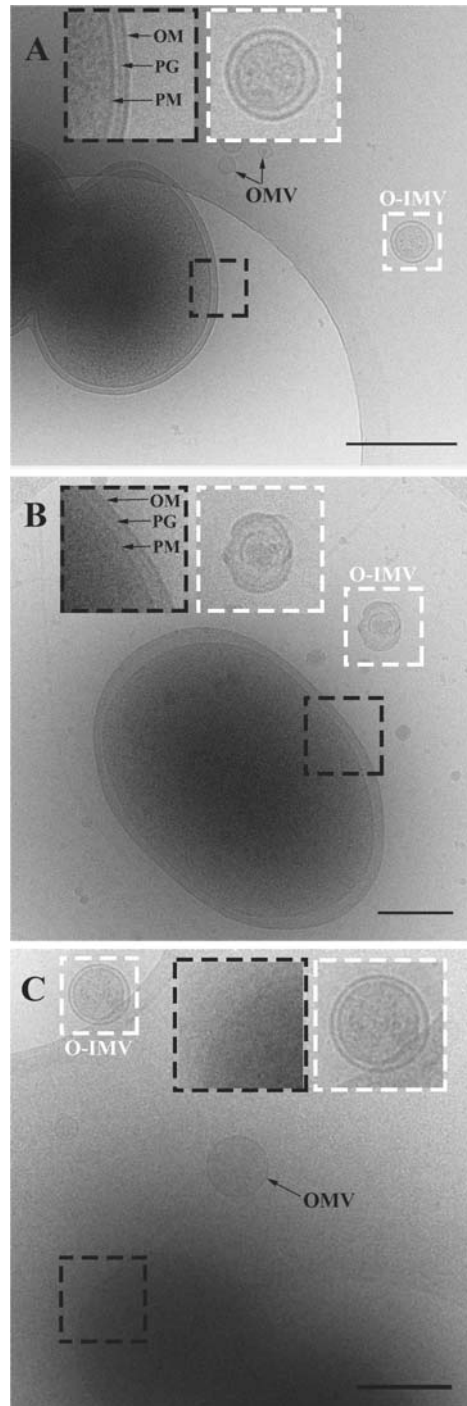
doi:10.1371/journal.pone.0116896.g002

As in the extracellular matter from the three assayed strains, O-IMVs were also visualized by Cryo-TEM (Fig. 5, white arrows), although single-layer OMVs predominated in all analyzed fields. After counting more than 7000 vesicles per strain in two independent experiments, the percentage of O-IMVs with respect to the total MVs was  $0.54\% \pm 0.058$  for *Pseudomonas* PAO1,  $0.23\% \pm 0.056$  for *A. baumannii* AB41, and  $1.2\% \pm 0.07$  for *N. gonorrhoeae*. Although the proportion of O-IMVs observed in *N. gonorrhoeae* was notably higher, it does not mean



**Figure 3. O-IMV visualized by TEM.** TEM micrographs from HPF-FS sections of MVs isolated from (A) *N. gonorrhoeae*, (B) *Pseudomonas* PAO1 and (C) *A. baumannii*. O-IMVs observed in MV preparations from the three strains have certain features in common: all are surrounded by an external bilayer, probably corresponding to the outer membrane (OM) of the cell, and contain an inner membrane, probably corresponding to the plasma membrane (PM) of the cell, which entraps a high electron-dense material. In the image of O-IMVs from *A. baumannii* the putative peptidoglycan layer (PG) can be seen. Bars 100 nm.

doi:10.1371/journal.pone.0116896.g003



**Figure 4. Cryo-TEM visualization of O-IMVs in pathogenic bacteria.** Cryo-electron micrographs showing whole plunge-frozen cells from three pathogenic bacteria, and their derived O-IMVs: (A) *N. gonorrhoeae*, (B) *Pseudomonas* PAO1, and (C) *A. baumannii*. Whole cells with well-defined envelopes are observed in A and B (large black squares show a magnified area of cell envelopes). The new O-IMVs in the three analyzed samples exhibit the same double layer as cells, and are filled with an electron-dense material similar to that seen in the cell cytoplasm (large white squares show a magnified area of the O-IMV). Conventional OMVs are also visualized in images A and C (black arrows). OM: Outer Membrane; PM: Plasma membrane; PG: Peptidoglycan. Bars, 500 nm (A, C) and 250 nm (B).

doi:10.1371/journal.pone.0116896.g004

this strain produces more of this new type of vesicle, because the vesicles were obtained from confluent solid cultures and not from liquid cultures, rendering the results incomparable.

The mean diameter and diameter range were also measured for both types of MVs (Table 1). Although the range of diameters was very broad for each type of vesicle and for each strain, most OMVs presented a diameter of 40–60 nm for *N. gonorrhoeae*, 20–40 nm for *A. baumannii* and 50–100 nm for *Pseudomonas* PAO1, while the new O-IMV vesicles were larger, mostly between 60–100 nm for *N. gonorrhoeae*, 100–140 nm for *Pseudomonas* PAO1 and 125–160 nm for *A. baumannii*. No membrane fragments from lysed cells were observed in thin frozen foils of MVs from *N. gonorrhoeae* and *A. baumannii*, while only a few were detected in *P. aeruginosa* PAO1 MV preparations.

### DNA content in MVs from pathogenic bacteria

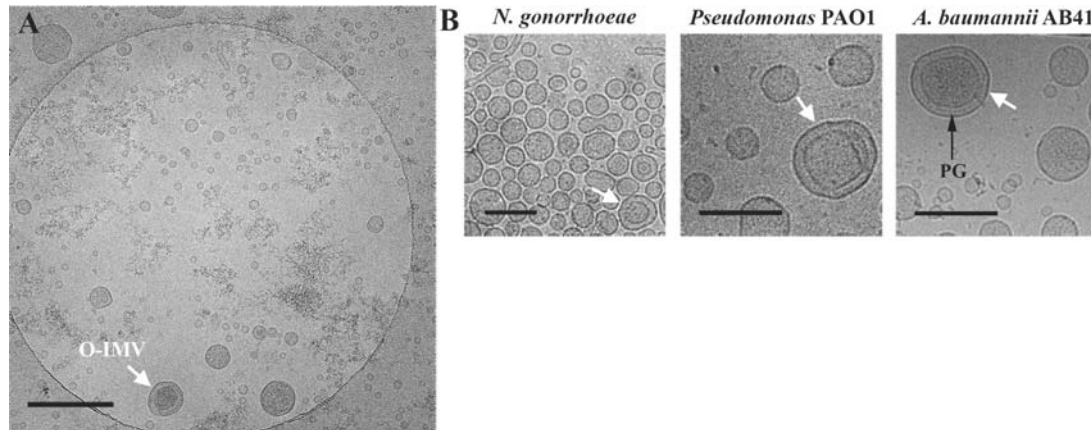
MVs isolated from exponentially growing cultures were used to measure the DNA content before and after a DNase treatment. The DNA was quantified by the Picogreen assay, which is an ultrasensitive method for the detection of double-stranded DNA, with minimal fluorescence contributed by RNA and single-stranded DNA. The DNA content of MVs from the three analyzed strains can be seen in Table 2. As expected, the DNA quantified was encapsulated mostly inside the MVs and protected from hydrolysis by exogenous DNases.

### Immunolabeling reveals DNA is packaged inside O-IMVs

To verify that DNA was present in the new O-IMVs and not in conventional OMVs, we performed an immunogold labeling of MVs with an antibody specific for double-stranded DNA. We used the vesicles isolated from *N. gonorrhoeae*, since this strain secreted a larger amount of O-IMVs than the other assayed bacteria. For this assay, thin sections of MV samples were deposited onto grids. Before the immunolabeling, the grids were digested with 100 µg/ml of proteinase K for 15 minutes at 37°C to expose the DNA. Both conventional OMVs with a single-bilayer and the double-bilayer O-IMVs were observed (Fig. 6), and as expected, the gold mark appeared almost exclusively in the latter, specifically inside the inner membrane of vesicles containing an electron-dense material (Figs. 6A and S1). To check that the gold immunolabeling was specific, we conducted several control experiments. No gold marking was observed when the primary antibody was not used (Fig. 6B) or when the grids were pretreated with DNase before the immunolabeling (Fig. 6C), showing that the DNA within double-bilayer vesicles was degraded by DNase treatment.

### Cytoplasm and plasma membrane components detected in *N. gonorrhoeae* MVs by proteomic analysis

Previous proteomic studies of MVs isolated from *P. aeruginosa* and *A. baumannii* reported the presence of cytoplasmic and PM proteins, although the mechanism by which they are incorporated in the vesicles has remained perplexing [9], [10]. We carried out a proteomic analysis of



**Figure 5. Quantification of O-IMVs on thin frozen foils from the total MVs using Cryo-TEM.** (A) Overview of a thin frozen foil obtained from *A. baumannii*. Single-layer vesicles are highly abundant, while double-layer O-IMVs can be observed in all the tracked fields, but much less often (white arrows). (B) Cryo-TEM images of thin frozen foils from the MVs of the three assayed strains. Both types of vesicles are observed, the single-layer OMVs and the new double-layer O-IMVs (white arrows). In *A. baumannii* O-IMVs, the presence of the putative intact peptidoglycan layer is also observed (PG). Bars 500 nm (A) and 200 nm (B).

doi:10.1371/journal.pone.0116896.g005

MVs from *N. gonorrhoeae*, which has not been described previously, to identify the proteins associated with vesicles in this pathogenic bacterium and determine their subcellular localization. Isolated MVs were further purified on an OptiPrep density gradient to remove contaminants. The 161 proteins detected in the MVs from *N. gonorrhoeae* were classified according to their cellular localization, which was established using the bacterial localization prediction software PSORTb v3.0.2 (Fig. 7A). OM proteins constituted 18.6% of all proteins identified, and were mainly associated with the cell wall and membrane biogenesis and transport. Notably, some of these OM proteins identified in *N. gonorrhoeae* vesicles are known to act as gonococcal virulence factors, including Pilus-related proteins, opacity-associated (Opa) OM proteins, and the complement regulatory *Neisseria* surface protein (NspA). Periplasmic proteins, mainly related with nutrient transport, were also identified (11.2%). As in nearly all proteomic studies of bacterial MVs, the proteomic analysis of MVs from *N. gonorrhoeae* identified proteins from the PM (13.7%) and the cytoplasm (18%), whose broad range of functions are summarized in Fig. 7B. The most abundant proteins with a known function localized in the PM were a carboxy-terminal processing protease and the thiol:disulfide interchange protein DsbD involved in the cytochrome complex assembly. The most abundant proteins identified in the cytoplasm were pyruvate dehydrogenase, the 60 kDa chaperonin and the elongation factor Tu. Similar to the proteome profiles of other bacterial MVs, we found ribosomal proteins, specifically 50S

**Table 1. Diameter mean values and diameter ranges expressed in nm from OMVs and O-IMVs for each analyzed strain.**

Strain	OMV		O-IMV	
	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range
<i>N. gonorrhoeae</i>	57 ± 19	25–140	85 ± 26	40–170
<i>Pseudomonas</i> PAO1	85 ± 28	30–165	135 ± 34	55–145
<i>A. baumannii</i> AB41	44 ± 32	15–320	109 ± 52	65–260

doi:10.1371/journal.pone.0116896.t001

**Table 2. DNA and ATP quantification in MVs.**

Strain	DNA <sup>a</sup>			ATP <sup>b</sup> (nmol/g protein)
	(ng DNA / μg prot)			
	DNase	No DNase	% DNase protected	
<i>N. gonorrhoeae</i>	1.11 ± 0.26	1.87 ± 0.42	59	0.57 ± 0.27
<i>Pseudomonas</i> PAO1	0.13 ± 0.04	0.20 ± 0.06	65	0.09 ± 0.01
<i>A. baumannii</i> AB41	1.54 ± 0.30	2.64 ± 1.23	62	2.61 ± 1.07

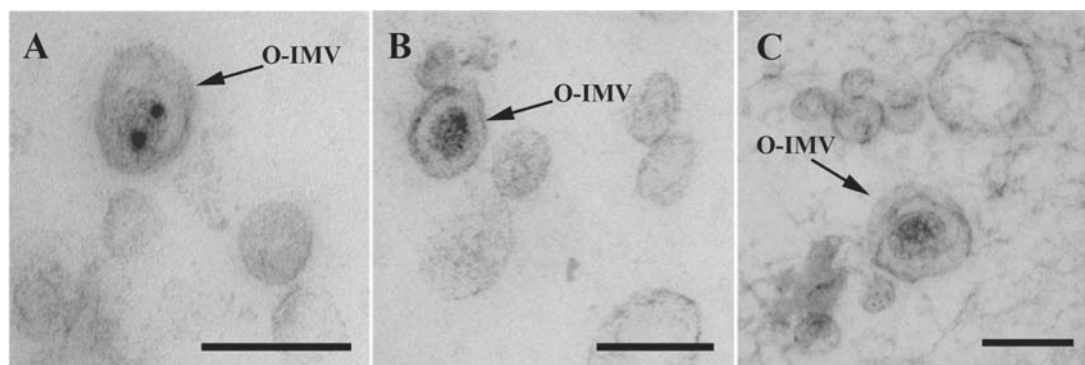
Data are the means ± standard deviations of the average intensity from: (a) three independent assays, (b) two independent assays.

doi:10.1371/journal.pone.0116896.t002

ribosomal protein L1 and the 30S ribosomal proteins S7 and S9. Few extracellular proteins were identified (1.2%), and many proteins with unknown subcellular localization or multiple localization sites were also detected (37.3%), some of them being virulence factors, such as the IgA1 endopeptidase and proteins from the PilS cassette. The subcellular localization, biological function and molecular function of each protein identified in MVs from *N. gonorrhoeae* are available in the Supporting Information (S1 Table).

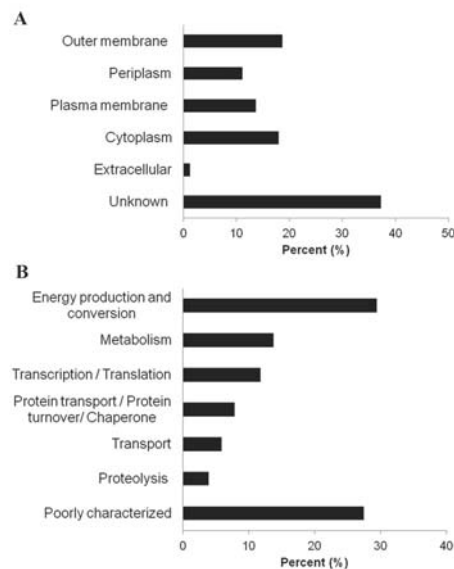
### ATP detection in MVs from pathogenic bacteria

ATP is a cytoplasmic component and is the universal energy currency used in many biological processes. In recent years, several reports have detected the presence of extracellular ATP in the culture supernatants of a wide variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria, but the mechanism for its secretion is not clear [26]. We performed an ATP quantification in MVs isolated from the three pathogenic strains using the BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay. This luciferase-based assay correlates the luminescence emitted with an ATP standard curve. ATP was detected inside the MVs of each pathogenic strain, and the luminescent signal obtained for all samples was about 10<sup>5</sup> Relative light units (RLU). The ATP concentration referred to protein is detailed in Table 2.



**Figure 6. DNA gold immunolabeling on Lowicryl HM20 thin sections of HPF-FS isolated MVs from *N. gonorrhoeae*.** (A) TEM micrograph showing an O-IMV immunolabeled with a monoclonal IgM specific against dsDNA and a secondary goat anti-mouse antibody coupled to 12-nm colloidal gold. The gold mark is localized inside the inner layer that contains the electron-dense material, which confirms that the DNA is packaged within the new O-IMV. (B) TEM micrograph of MVs labeled only with the secondary antibody. (C) TEM micrograph of MVs from grids preincubated with 1 mg/ml DNase I and then immunolabeled with the anti-dsDNA IgM and a secondary antibody coupled to gold. Bars, 100 nm.

doi:10.1371/journal.pone.0116896.g006



**Figure 7. Protein content from the *N. gonorrhoeae*-derived MVs.** (A) Distribution of proteins identified from the total MVs from *N. gonorrhoeae* based on their subcellular location. (B) Functional classification of the 51 proteins predicted to be localized in the cytoplasm and plasma membrane of *N. gonorrhoeae* cells.

doi:10.1371/journal.pone.0116896.g007

## Discussion

The existence of membrane vesicles (MVs) was first discovered by use of electron microscopy in the 1960s in culture supernatants of *Escherichia coli* [1]. Since then, the production of vesicles with multiple functions has been widely observed in both prokaryotic and eukaryotic organisms [27]. In Gram-negative bacteria, these vesicles have been named “outer membrane vesicles” (OMVs), and are known to favour virulence and host colonization in many pathogenic bacteria [2].

Although knowledge of OMV functions in bacteria has increased substantially in recent years, the mechanism by which vesiculation occurs remains unclear. Current models of vesiculation, which begin with budding events observable by electron microscopy, all coincide that OMVs can be defined as small spherical structures of 20–200 nm derived from the bacterial OM and that they have a common structure comprising an outer lipid bilayer surrounding material from the periplasm [1], [27]. This definition of OMVs has remained unchanged since their discovery, suggesting that Gram-negative bacteria produce a single morphological type of vesicle. The repeated detection of cytoplasmic components and plasma membrane proteins, which in accordance with this definition should not be present in the vesicles, has not been explained [5], [7], [18], [27].

In recent years, improvements in TEM and Cryo-TEM techniques have enabled the imaging of biological specimens with greatly enhanced resolution. TEM observation of specimens cryoimmobilized by High Pressure Freezing (HPF) followed by Freeze Substitution (FS) and



sectioning, together with Cryo-TEM observation of frozen-hydrated specimens, allow visualization of biological samples close to their native state, enabling us to refine our knowledge of known bacterial structures and to discover new ones [22], [28], [29]. These techniques allowed us to visualize the formation of a new type of MVs in the Antarctic bacterium *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> [22].

The structural study of the three pathogenic strains by TEM showed extracellular matrices full of MVs, which were mainly conventional OMVs. However, also visualized in several of the analyzed fields were the new O-IMVs, with a double-bilayer and containing highly electron-dense material very similar to cytoplasmic content. In addition, small rough areas, very similar to the ribosomes found in the cell cytoplasm, were also observed in some O-IMVs.

Although analysis of ultrathin sections by TEM after HPF-FS currently allows a good preservation of cell components and also correctly displays the extracellular matrices, this process is not completely free of artifacts [22], [29]. For this reason, the three strains were also analyzed by Cryo-TEM, because this technique is the least artifactual and allows the sample to be visualized close to the natural state, with minimal sample manipulation. For visualization by Cryo-TEM, bacteria are embedded in a thin layer of water, vitrified by rapid immersion in ethane and directly visualized by Cryo-microscopy at liquid nitrogen temperatures without any added contrast agent [30].

Through Cryo-TEM, we were again able to demonstrate that all three pathogenic strains produce both types of MVs: single layer OMVs and double layer O-IMVs containing a material similar to the bacterial cytoplasm. Thus, structural analysis by TEM and Cryo-TEM confirmed that *N. gonorrhoeae*, *P. aeruginosa* PAO1 and *A. baumannii* AB41 produce more than one type of MV, showing a predominance of OMVs and a small proportion of the new O-IMVs.

The reason why these new vesicles have not been visualized before is probably their low rate of production. O-IMVs constituted close to 0.2% of all vesicles observed in *A. baumannii* AB41, about 0.5% in *P. aeruginosa* PAO1 and 1.2%, in *N. gonorrhoeae*. Consequently, their detection by TEM and Cryo-TEM required the analysis of many fields. These low proportions of O-IMVs seem reasonable when considering that their formation involves momentary ruptures of the cell wall and plasma membrane, which may compromise cell viability. This suggests their formation and release are rapid processes and extremely difficult to capture. Not surprisingly, there are few images in the literature of the exact moment that a conventional OMV is released from a bacterium [6], [31], [32]. It is therefore notable that we were able to visualize the formation of a new O-IMV in *N. gonorrhoeae*.

It should also be emphasized that the new O-IMVs and their proportion were analyzed in samples obtained under optimal culture conditions to prevent cell lysis, which could generate membrane recircularization leading to artifactual atypical vesicles. Furthermore, all analyses were carried out in the absence of agents that could alter the cellular integrity, such as antibiotics. This is worthy of mention, since atypical membrane vesicles with a possible resemblance to O-IMVs have been formed in the presence of antibiotics. For example, Kurundurungawa and Beveridge observed that after treatment with gentamicin, *P. aeruginosa* PAO1 had an altered cellular appearance and produced a complex type of vesicle incorporating PM and cytoplasmic content [31]. However, the definition of the images provided by this study is too low to distinguish whether the vesicles are equivalent to the O-IMVs spontaneously produced by our test strains [31]. A study of the *A. baumannii* strain ATCC19606T by Cryo-electron tomography also provided images of MVs apparently with a PM and OM, whose production increased when suboptimal concentrations of antibiotic were added to the cultures [33]. In a Cryo-TEM study of *Borrelia burgdorferi* the addition of the borreliacidal antibody OspA induced the formation of very large vesicles containing a material very similar to cytoplasm, which may also resemble the O-IMVs described here [34]. These observations suggest that O-IMV production

could be induced by bacteria in stressful or adverse situations. This would be of particular importance in pathogenic bacteria, because an antibiotic treatment or the host immune system could stimulate the production of new O-IMVs, with implications for the development of bacterial infection and the appearance of antibiotic resistance.

The presence of DNA in MVs of *N. gonorrhoeae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* has been described [17], [20], [21]. Furthermore, the transfer of antibiotic resistance plasmids by MVs has been shown in *N. gonorrhoeae* and *A. baumannii*. None of these studies resolved the question of how the DNA is included in the interior of the vesicles, and to date three possible mechanisms have been proposed [22]. Renelli et al suggest that the DNA present in the medium due to cell lysis can be internalized by a mechanism similar to bacterial transformation [17]. Alternatively, the DNA somehow passes through the periplasm of a protected form and is included in a conventional OMV [31]. This model has never been demonstrated experimentally, although several articles defend its validity [5], [17]. Finally, the third model demonstrated in the Antarctica strain *S. vesiculosa* M7<sup>T</sup> by our group, explains the inclusion of DNA by the formation of more complex vesicles (O-IMVs), which incorporate both PM and cytoplasmic content, and therefore also DNA. Our current work shows that this third model can be extended to other Gram-negative bacteria species, since the O-IMVs formed by the three analyzed strains internalize DNA in a way that protects it from the action of exonucleases. Furthermore, DNA immunolabeling with a specific antibody for dsDNA allowed us to visualize and confirm that the quantified DNA was packaged within the O-IMVs of the pathogenic bacteria. The type of DNA in the vesicles could not be distinguished by immunolabeling, although vesicles of *N. gonorrhoeae* have been reported to contain both plasmid and chromosomal DNA [20].

The proteomics of MVs have been reported in *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, but not, as far as we know, in *N. gonorrhoeae* strains [9–11]. Thus, the dual aim of our proteomic study was to identify which proteins were exported in the MVs of *N. gonorrhoeae* and to determine their subcellular localization. As in *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, the proteomic analysis identified more proteins of the cytoplasm (C) and PM than the periplasm (P) and OM, although in total OM proteins were more abundant than those of the C and PM [9–11]. While OM and P proteins are considered a natural component of Gram-negative bacteria MVs, the presence of C and PM proteins lacks a clear explanation.

Some authors attribute the presence of cellular debris to improper preparation of vesicle samples [1]. Although this is possible, it seems unlikely to have occurred in all the rigorous studies published [7], [8], [12], [16]. Another possible explanation for the presence of cytoplasmic proteins is that some are highly conserved moonlighting proteins, which may have multiple simultaneous locations and perform more than one biological function. Several moonlighting proteins, which exercise their primary function in the cytoplasm, have also been found on the surface of bacteria acting as virulence factors [35], [36]. This would be the case of some of the proteins identified in the proteomic study of *N. gonorrhoeae* MVs, such as pyruvate dehydrogenase, enolase, chaperone DnaK and elongation factor Tu [36], [37]. However, based on current knowledge, many of the proteins detected in *N. gonorrhoeae* MVs would be localized exclusively in the cytoplasm or PM, including those associated with the ATP synthase complex and ribosomal proteins. Finally, a third explanation is that C and PM proteins were incorporated into the O-IMVs in the vesiculation process.

Another interesting finding in the analysis of the three pathogenic strains was the presence of ATP inside their MVs. To our knowledge, this is the first time that ATP has been described in MVs of Gram-negative bacteria. This is a noteworthy feature since ATP is a unique component of the cell cytoplasm, being considered the universal energy currency of many biological processes, such as active transport, nucleic acid synthesis and movement [38]. As in other components, the presence of ATP in the O-IMVs can be explained by its incorporation during

vesiculation, but its functionality remains unclear. However, several of the proteins identified in the proteome of MVs from *N. gonorrhoeae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* contain ATP binding sites and require the ATP cofactor to function properly, as is the case of enzymes involved in glycolysis or different chaperones; additionally, several subunits of the ATP synthase have been identified.

The detection of ATP in MVs raises various issues. On the one hand, there is the possibility that some of the vesicle proteins maintain their functionality once outside the cell. On the other, the presence of ATP might contribute to the inter- and intraspecies communication function of MVs, since it has recently been postulated that ATP can be used as an intercellular communication signal by eukaryotic and prokaryotic cells [5], [39]. Moreover, Mempin et al have found that Gram-negative bacteria release ATP into the culture medium during growth, although the mechanism remains to be determined [26]. It would be interesting to explore whether O-IMVs are involved in this secretion.

In conclusion, the production of these new O-IMVs, not only by Antarctic bacteria, but also by pathogenic Gram-negative bacteria, is significant, as it implies the existence of another vesiculation model. Besides their novelty, these vesicles offer an explanation for the presence of cytoplasmic and inner membrane components repeatedly described in MVs of Gram-negative bacteria. This assumes particular significance in the case of pathogenic bacteria in which MVs are associated with the transfer of DNA, toxins and other virulence factors. Future work should be addressed to confirming the role of these O-IMVs in pathogenesis and the factors that trigger their formation.

## Supporting Information

**S1 Table. Proteins identified from *N. gonorrhoeae* MVs with at least 2 high confidence peptides.** Molecular weight (MW); amino acid length (AA); cluster of orthologous groups (COG). (XLSX)

**S1 Fig. DNA gold immunolabeling on Lowicryl HM20 thin sections of HPF-FS isolated MVs from *N. gonorrhoeae*.** TEM micrographs showing O-IMVs immunolabeled with a monoclonal IgM specific against dsDNA and a secondary goat anti-mouse antibody coupled to 12-nm colloidal gold (black arrows). Bars, 100 nm. (TIF)

## Acknowledgments

We gratefully acknowledge the assistance of M.J Montes for the proper maintenance of the strains. The proteomics work was done at the Proteomics Platform of Barcelona Science Park, University of Barcelona, a member of ProteoRed-ISCI network.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CPC EM. Performed the experiments: CPC LD CLI EM. Analyzed the data: CPC EM. Contributed reagents/materials/analysis tools: CLI EM. Wrote the paper: CPC EM.

## References

1. Kulp A, Kuehn MJ (2010) Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* 64: 163–184. doi: [10.1146/annurev.micro.091208.073413](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413) PMID: [20825345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20825345/)

2. Kuehn MJ, Kesty NC (2005) Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* 19: 2645–2655. PMID: [16291643](#)
3. Ellis TN, Kuehn MJ (2010) Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 81–94. doi: [10.1128/MMBR.00031-09](#) PMID: [20197500](#)
4. Unal CM, Schaar V, Riesbeck K (2011) Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine. *Semin Immunopathol* 33: 395–408. doi: [10.1007/s00281-010-0231-y](#) PMID: [21153593](#)
5. Mashburn-Warren LM, Whiteley M (2006) Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol Microbiol* 61: 839–846. PMID: [16879642](#)
6. Beveridge TJ (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* 181: 4725–4733. PMID: [10438737](#)
7. Lee E-Y, Choi D-S, Kim K-P, Gho YS (2008) Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom Rev* 27: 535–555. doi: [10.1002/mas.20175](#) PMID: [18421767](#)
8. Lee JC, Lee EJ, Lee JH, Jun SH, Choi CW, et al. (2012) *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiol Lett* 331: 17–24. doi: [10.1111/j.1574-6968.2012.02549.x](#) PMID: [22428779](#)
9. Kwon S-O, Gho YS, Lee JC, Kim S II (2009) Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol Lett* 297: 150–156 doi: [10.1111/j.1574-6968.2009.01669.x](#) PMID: [19548894](#)
10. Choi D-S, Kim D-K, Choi SJ, Lee J, Choi J-P, et al. (2011) Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics* 11: 3424–3429. doi: [10.1002/prot.201000212](#) PMID: [21751344](#)
11. Toyofuku M, Roschitzki B, Riedel K, Eberl L (2012) Identification of Proteins Associated with the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Extracellular Matrix. *J Proteome Res* 11: 4906–4915. doi: [10.1021/pr300395j](#) PMID: [22909304](#)
12. Mullaney E, Brown PA, Smith SM, Botting CH, Yamaoka YY, et al. (2009) Proteomic and functional characterization of the outer membrane vesicles from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics Clin Appl* 3: 785–796. doi: [10.1002/prca.200800192](#) PMID: [21136987](#)
13. Sharpe SW, Kuehn MJ, Mason KM (2011) Elicitation of epithelial cell-derived immune effectors by outer membrane vesicles of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 79: 4361–4369. doi: [10.1128/IAI.05332-11](#) PMID: [21875967](#)
14. Pierson T, Matrakas D, Taylor YU, Manyam G, Morozov VN, et al. (2011) Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J Proteome Res* 10: 954–967. doi: [10.1021/pr1009756](#) PMID: [21138299](#)
15. Lappann M, Otto A, Becher D, Vogel U (2013) Comparative proteome analysis of spontaneous outer membrane vesicles and purified outer membranes of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 195: 4425–4435. doi: [10.1128/JB.00625-13](#) PMID: [23893116](#)
16. Lee E-Y, Bang JY, Park GW, Choi D-S, Kang JS, et al. (2007) Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics* 7: 3143–3153. PMID: [17787032](#)
17. Renelli M, Matias V, Lo RY, Beveridge TJ (2004) DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* 150: 2161–2169. PMID: [15256559](#)
18. Dorward DW, Garon CF (1990) DNA Is Packaged within Membrane-Derived Vesicles of Gram-Negative but Not Gram-Positive Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56: 1960–1962. PMID: [16348232](#)
19. Yaron S, Kolling GL, Simon L, Matthews KR (2000) Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66: 4414–4420. PMID: [11010892](#)
20. Dorward DW, Garon CF, Judd RC (1989) Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 171: 2499–2505. PMID: [2496108](#)
21. Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, et al. (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*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 3084–3090. doi: [10.1128/AAC.00929-10](#) PMID: [21518847](#)
22. Pérez-Cruz C, Carrión O, Delgado L, Martínez G, López-Iglesias C, et al. (2013) New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T: implications for DNA content. *Appl Environ Microbiol* 79: 1874–1881. doi: [10.1128/AEM.03657-12](#) PMID: [23315742](#)
23. McBroom AJ, Johnson AP, Vemulapalli S, Kuehn MJ (2006) Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J Bacteriol* 188: 5385–5392. PMID: [16855227](#)

24. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671–675. PMID: [22930834](#)
25. Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, et al. (2010) PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26: 1608–1615. doi: [10.1093/bioinformatics/btq249](#) PMID: [20472543](#)
26. Mempin R, Tran H, Chen C, Gong H, Kim Ho K, et al. (2013) Release of extracellular ATP by bacteria during growth. *BMC Microbiol* 13: 301. doi: [10.1186/1471-2180-13-301](#) PMID: [24364860](#)
27. Deatherage BL, Cookson BT (2012) Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun* 80: 1948–1957. doi: [10.1128/IAI.06014-11](#) PMID: [22409932](#)
28. Hurbain I, Sachse M (2011) The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells. *Biol Cell* 103: 405–420. doi: [10.1042/BC20110015](#) PMID: [21812762](#)
29. Delgado L, Carrión O, Martínez G, López-Iglesias C, Mercadé E (2013) The stack: a new bacterial structure analyzed in the Antarctic bacterium *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> by transmission electron microscopy and tomography. *PLoS One* 8: e73297. doi: [10.1371/journal.pone.0073297](#) PMID: [24039905](#)
30. Li Z, Jensen GJ (2009) Electron cryotomography: a new view into microbial ultrastructure. *Curr Opin Microbiol* 12: 333–340. doi: [10.1016/j.mib.2009.03.007](#) PMID: [19427259](#)
31. Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ (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. *J Bacteriol* 177: 3998–4008. PMID: [7608073](#)
32. Deatherage BL, Lara JC, Bergsbaken T, Rassoulian Barrett SL, Lara S, et al. (2009) Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol Microbiol* 72: 1395–1407. doi: [10.1111/j.1365-2958.2009.06731.x](#) PMID: [19432795](#)
33. Koning RI, de Breij A, Oostergetel GT, Nibbering PH, Koster AJ, et al. (2013) Cryo-electron tomography analysis of membrane vesicles from *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 T. *Res Microbiol* 164: 397–405. doi: [10.1016/j.resmic.2013.02.007](#) PMID: [23517882](#)
34. Kudryashev M, Cyrklaff M, Baumeister W, Simon MM, Wallich R, et al. (2009) Comparative cryo-electron tomography of pathogenic Lyme disease spirochetes. *Mol Microbiol* 71: 1415–1434. doi: [10.1111/j.1365-2958.2009.06613.x](#) PMID: [19210619](#)
35. Aguilera L, Toloza L, Giménez R, Odena A, Oliveira E, et al. (2013) Proteomic analysis of outer membrane vesicles from the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917. *Proteomics* 14: 222–229.
36. Henderson B, Martin A (2011) Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect Immun* 79: 3476–3491. doi: [10.1128/IAI.00179-11](#) PMID: [21646455](#)
37. Kunert A, Losse J, Gruszin C, Hühn M, Kaendler K, et al. (2007) Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J Immunol* 179: 2979–2988. PMID: [17709513](#)
38. Hironaka I, Iwase T, Sugimoto S, Okuda K, Tajima A, et al. (2013) Glucose triggers ATP secretion from bacteria in a growth-phase-dependent manner. *Appl Environ Microbiol* 79: 2328–2335. doi: [10.1128/AEM.03871-12](#) PMID: [23354720](#)
39. Xi C, Wu J (2010) dATP/ATP, a multifunctional nucleotide, stimulates bacterial cell lysis, extracellular DNA release and biofilm development. *PLoS One* 5: e13355. doi: [10.1371/journal.pone.0013355](#) PMID: [20976227](#)

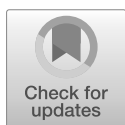
RESEARCH ARTICLE

# Membrane Vesicles Released by a hypervesiculating *Escherichia coli* Nissle 1917 *tolR* Mutant Are Highly Heterogeneous and Show Reduced Capacity for Epithelial Cell Interaction and Entry

Carla Pérez-Cruz<sup>1</sup>, María-Alexandra Cañas<sup>2,3</sup>, Rosa Giménez<sup>2,3</sup>, Josefa Badia<sup>2,3</sup>, Elena Mercade<sup>1</sup>, Laura Baldomà<sup>2,3\*</sup>, Laura Aguilera<sup>2,3</sup>

**1** Secció de Microbiologia, Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Secció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

\* [lbaldoma@ub.edu](mailto:lbaldoma@ub.edu)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Pérez-Cruz C, Cañas M-A, Giménez R, Badia J, Mercade E, Baldomà L, et al. (2016) Membrane Vesicles Released by a hypervesiculating *Escherichia coli* Nissle 1917 *tolR* Mutant Are Highly Heterogeneous and Show Reduced Capacity for Epithelial Cell Interaction and Entry. PLoS ONE 11(12): e0169186. doi:10.1371/journal.pone.0169186

**Editor:** Maria Kaparakis-Liaskos, Hudson Institute, AUSTRALIA

**Received:** July 5, 2016

**Accepted:** December 13, 2016

**Published:** December 30, 2016

**Copyright:** © 2016 Pérez-Cruz et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work received funding from the following sources: grant AGL2012-34985 (co-financed with European Commission ERDF funds) to LB and grant CTQ2014-59632-R to EM, both from the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain; and grants 2014SGR1017 and

## Abstract

Membrane vesicles (MVs) produced by Gram-negative bacteria are being explored for novel clinical applications due to their ability to deliver active molecules to distant host cells, where they can exert immunomodulatory properties. MVs released by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) are good candidates for testing such applications. However, a drawback for such studies is the low level of MV isolation from *in vitro* culture supernatants, which may be overcome by the use of mutants in cell envelope proteins that yield a hypervesiculation phenotype. Here, we confirm that a *tolR* mutation in EcN increases MV production, as determined by protein, LPS and fluorescent lipid measurements. Transmission electron microscopy (TEM) of negatively stained MVs did not reveal significant differences with wild type EcN MVs. Conversely, TEM observation after high-pressure freezing followed by freeze substitution of bacterial samples, together with cryo-TEM observation of plunge-frozen hydrated isolated MVs showed considerable structural heterogeneity in the EcN *tolR* samples. In addition to common one-bilayer vesicles (OMVs) and the recently described double-bilayer vesicles (O-IMVs), other types of MVs were observed. Time-course experiments of MV uptake in Caco-2 cells using rhodamine- and DiO-labelled MVs evidenced that EcN *tolR* MVs displayed reduced internalization levels compared to the wild-type MVs. The low number of intracellular MVs was due to a lower cell binding capacity of the *tolR*-derived MVs, rather than a different entry pathway or mechanism. These findings indicate that heterogeneity of MVs from *tolR* mutants may have a major impact on vesicle functionality, and point to the need for conducting a detailed structural analysis when MVs from hypervesiculating mutants are to be used for biotechnological applications.

2014SGR1325 from the Departament d'Innovació, Universitats i Empresa from the Autonomous Government of Catalonia. CPC was a recipient of the fellowship APIF2015 from the Universitat de Barcelona. The funders has no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Commensal and pathogenic Gram-negative bacteria have evolved different systems to contact host cells. One mechanism is the formation of membrane vesicles that can deliver the cargo to distant targets in the host [1]. Bacterial membrane vesicles (MVs) are spherical membranous structures with diameters ranging between 20 and 300 nm. Produced during the normal growth of Gram-negative bacteria, they enable a protected secretion of proteins, lipids, RNA, DNA and other effector molecules [2,3]. Many studies with Gram-negative pathogens conducted in the last decade have shown that MVs are internalized in host cells and contribute to virulence by delivering cytotoxic factors as well as mediators that interfere with the immune system [4,5]. When first discovered, MVs from pathogenic bacteria were proposed as vaccines, and research in this field continues [6–8]. Promising novel therapy applications include using engineered MVs expressing antigens from pathogenic strains or as specialized drug delivery vehicles [9,10].

One drawback for functional and applied studies with MVs is the low yield of vesicles recovered from *in vitro* culture supernatants. Different strategies have been assayed to improve yields, such as growing bacteria under stressed conditions, in the presence of antibiotics, or the use of mutants in components of the cell envelope [11–15]. MV formation takes place after the outer membrane is detached from the peptidoglycan (PG) located in the periplasmic space. For this reason, crosslinking of the PG with membrane components is needed for cell stability and has been studied extensively. The PG interacts with the outer membrane porin OmpA and with the Tol-Pal protein complex, and establishes covalent cross-linking with Brauns's lipoprotein (Lpp). Under natural conditions, changes in the interaction between these envelope components without disturbance of the membrane stability are described as crucial for MV biogenesis. With the aim of increasing MV production, different groups have obtained mutants in genes encoding cell envelope proteins. Thus, *ompA* mutants of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Acinetobacter baumannii* [16–18], as well as *tol-pal* mutants of *E. coli* and *Helicobacter pylori* [19,20] have been reported as “hypervesiculating” strains, suitable for a high production of MVs under different growth conditions. A recent study analyzing MV production by the mutant strains of the Keio Collection identified around 150 genes involved in the vesiculation process. It was shown that mutations altering outer membrane structures generally lead to hypervesiculation phenotypes [21].

There is a need to characterize and quantify the MVs obtained from over-producing phenotypes. Different methods have been used to measure vesiculation levels but generally without clarifying the MV structure and composition [1]. In most published studies, MV morphology and integrity is revealed by transmission electron microscopy (TEM) micrographs from negatively stained MVs [13,19,22,23]. Although this technique is useful to confirm the presence of MVs, the resolution is insufficient to visualize irregular or atypical MVs, which may be obtained when working with genetically manipulated strains. Hypervesiculating mutants can produce atypical MVs, which may have surface antigens with a different conformation or display altered immunogenicity, self-adjuvation, or uptake by host cells. The variability caused by these features can affect studies evaluating the application of MVs in different fields [8–10].

In recent years, improvements in TEM and cryo-TEM techniques have enabled the imaging of biological specimens with greatly enhanced resolution. TEM observation of specimens cryoimmobilized by High Pressure Freezing (HPF) followed by Freeze Substitution (FS) and sectioning, together with cryo-TEM observation of frozen-hydrated specimens, allow visualization of biological samples close to their native state, enabling us to refine our knowledge of bacterial structures [24,25]. These techniques enabled us to visualize the formation of a new

type of MVs in environmental and pathogenic bacteria [26,27], and may therefore be useful to characterize the fine structure of MVs from hypervesiculating strains.

*Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) is a probiotic used for the treatment of intestinal disorders. Its MVs modulate the cytokine /chemokine response of epithelial and immune cells in different *in vitro* and *ex vivo* models [28]. Moreover, engineered MVs derived from EcN are being analyzed as recombinant subunit antigen carriers for the development of pathogen-mimetic vaccines [29]. In this work, we constructed a *tolR* mutant derived from this probiotic strain. We analyzed the growth and vesiculation capacity of the EcN *tolR* mutant, and structurally characterized its MVs. For this purpose, wild type and *tolR* mutant EcN, as well as their derived MVs, were analyzed by TEM after HPF-FS and cryo-TEM. MV uptake by Caco-2 cells was analyzed as a functional parameter to evaluate whether EcN *tolR*-derived MVs are efficiently internalized by intestinal epithelial cells.

## Materials and Methods

### Bacterial strains and cell growth

The probiotic strain EcN (serotype O6:K5:H1) was provided by Ardeypharm GmbH (Herdecke, Germany). The mutant strain EcN *tolR* was constructed in this study by P1-transduction from *E. coli* strain TPS300 (*tolR::Ωcm*). Gene disruption was confirmed by PCR (S1 Fig). This mutation does not cause polarity to downstream *tolAB* genes [30]. For growth monitoring and MV production, EcN and EcN *tolR* were routinely grown at 37°C in Luria-Bertani broth (LB) in an orbital shaker at 250 rpm. Chloramphenicol (Cm) was added to the medium at 20 µg/ml final concentration. For HPF-FS methods, cells were grown on Trypticase Soy Agar (TSA, Oxoid) for 18 h at 37°C. Growth was monitored by measuring the optical density (OD) at 580 nm. Bacterial cells were counted by plating serial dilutions on LB agar plates.

### Isolation of MVs

MVs were isolated from culture supernatants as described previously [31]. Briefly, bacterial cells were grown aerobically in LB for 15 h and pelleted by centrifugation at 10,000 × *g* for 20 min at 4°C. The supernatants were filtered through a 0.22 µm-pore-size filter (Millipore) to remove residual bacteria and concentrated by centrifugation in a 100K Centricon<sup>®</sup> Plus-70 filter device (Millipore), followed by an additional filtration step. MVs were recovered by centrifugation at 150,000 × *g* for 1 h at 4°C, washed and resuspended in phosphate buffered saline (PBS). MVs were again pelleted (150,000 × *g*, 1 h) and finally resuspended in an adequate volume of PBS. Sterility of samples was assessed on TSA agar plates.

### Quantification of MVs

MVs produced by EcN and EcN *tolR* from 1L of culture were quantified by three different methods. Protein concentration was measured by the Lowry method [32]. LPS content was quantified by the Purpald assay as described previously, using KDO as a standard [33]. Lipid content associated with MVs was determined using the lipophilic fluorescent dye FM4-64 (ThermoFisher) as described previously [34]. Briefly, a portion of the sterile resuspended MVs was incubated with FM4-64 (5 µg/ml in PBS) for 10 min at room temperature. MVs alone and the FM4-64 probe alone were used as negative controls. After excitation at 515 nm, emission at 640 nm was measured with the multiplate reader SYNERGY HT (Biotek). Fluorescence was normalized by colony forming units (CFU), determined by the dilution plating method. All quantifications were done by triplicate in three independent experiments.



### Protein identification by LC-MS/MS

MV samples (10 µg protein) were separated by 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [35], and protein bands were visualized by staining with Sypro<sup>®</sup> Ruby Protein Gel Stain (Molecular Probes™), following the protocol of the manufacturer. Differential protein bands between samples were excised for protein identification at the Proteomic Platform at The Scientific Park of Barcelona. Protein bands were digested with trypsin and analyzed in a NanoAcquity (Waters) coupled to LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) mass spectrometer essentially as described previously [31]. Data were acquired in raw data format using the software Thermo Xcalibur (v.2.2). A database was created by merging the protein entries present in the public database Swiss-Prot *E. coli* (v. 10/10/2016) with a database containing all entries for *E. coli* Nissle 1917 from NCBI (v. 10/10/2016). The raw files obtained in the mass spectrometry analyses were used to search the database described above. The software used was Proteome Discoverer (v.1.4.1.14), with Sequest HT as the search engine. Both target and decoy databases were searched to obtain a false discovery rate (FDR) in order to discriminate between correct and incorrect peptide spectrum matches, using the same q-values as previously described [31]. The lists of identified proteins for each sample are provided as Supporting Information (S1 Table).

### Western Blotting of Lipopolysaccharide (LPS)

Western blot analysis of LPS was performed as described previously, using specific antibodies against *E. coli* LPS (Abcam) (1:5,000 dilution, overnight at 4°C) and donkey anti-rabbit immunoglobulin horseradish peroxidase-linked (GE Healthcare) as a secondary antibody (dilution 1:15,000, 1 h at room temperature) [28]. The protein-antibody complex was visualized using the ECL Plus Western blotting detection system (GE Healthcare).

### Negative staining and TEM

Isolated MVs were examined by TEM after negative staining as described previously [36]. Formvar/carbon-coated copper grids were activated by UV light. Isolated MVs were adsorbed on grids for 1 min and then washed with distilled water. Grids were stained with 2% uranyl acetate for 1 min. After rinsing, grids were viewed with a Tecnai Spirit electron microscope (FEI Company, Netherlands) at an acceleration voltage of 120 kV.

### TEM observation after HPF-FS

TEM observation of EcN and EcN *tolR* strains after HPF-FS was performed as described previously [34]. For this purpose, cells were grown on TSA agar plates at 37°C for 18 hours. Briefly, bacterial colonies were cryoimmobilized using a Leica EMPact high-pressure freezer (Leica, Austria), and were freeze-substituted in a Leica EM automatic freeze substitution (AFS) system (Leica, Austria), where the substitution was performed in pure acetone containing 2% (w/v) osmium tetroxide and 0.1% (w/v) uranyl acetate. Samples were embedded in Epon 812 (Ted Pella, Inc.). Epon-embedded thin sections were examined in a Tecnai Spirit electron microscope (FEI Company, Netherlands) at an acceleration voltage of 120 kV.

### Cryo-TEM analysis of isolated MVs

For cryo-TEM observation of isolated MVs, samples were prepared as described above for MV isolation from liquid cultures. Cryo-TEM analysis was performed as described previously [27]. Briefly, MV suspensions (5 µl) were applied on freshly glow-discharged Quantifoil R 2/2 grids (Quantifoil Micro Tools GmbH, Germany) and allowed to adhere for 4 min. The samples

were vitrified using a Vitroblot (FEI Company, Netherlands), and were transferred to a Tecnai F20 microscope (FEI Company, Netherlands), using a Gatan cryotransfer system (Gatan Inc. CA, USA). Cryo-TEM visualizations were carried out at a temperature between  $-170^{\circ}\text{C}$  and  $-175^{\circ}\text{C}$  and at the accelerating voltage of 200 kV. Images were acquired using low-dose imaging conditions and an Eagle 4k x 4k Images charged-coupled device (CCD) camera (FEI Company, Netherlands).

**MV internalization by Caco-2 cells.** The human colonic cell line Caco-2 (ATCC HTB-37) was obtained from the American Type Culture Collection. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 25 mM HEPES, 1% non-essential amino acids and penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Gibco BRL). Cultures were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$ .

To monitor MV internalization in intestinal epithelial cells, MVs were fluorescently labelled with octadecyl rhodamine B-R18 (Life Technologies) as described previously [28]. MVs, purified as described above, were washed with PBS, resuspended in labelling buffer (50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 100 mM NaCl, pH 9.2) in the presence of 1 mg/ml octadecyl rhodamine B-R18 and incubated for 1 h at  $25^{\circ}\text{C}$ . Labelled MVs were pelleted by centrifugation at  $150,000 \times g$  for 1 h at  $4^{\circ}\text{C}$ , resuspended in PBS (0.2 M NaCl) and washed twice to fully remove the unbound dye. After a final centrifugation step, the rhodamine-labelled MVs were resuspended in PBS (0.2 M NaCl) containing a protease inhibitor cocktail (Complete Protease Inhibitor Tablet, Roche) and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for up to 6 weeks.

MV internalization assays were performed using Caco-2 cells (18–20 days post-confluence) grown in a 96-well black plate (Corning Incorporated, Costar<sup>®</sup>). Prior to the assay, the medium was replaced with rhodamine B-R18-labelled MVs (1  $\mu\text{g}$  protein/well) suspended in DMEM medium in the absence of phenol red and FCS. Cells were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  and fluorescence was measured over time using a Modulus<sup>™</sup> Microplate Fluorometer (Turner Biosystems) (Ex 570 nm; Em 595 nm). Fluorescence intensity was normalized by the fluorescence of labelled MVs in the absence of epithelial cells. To determine the mechanism involved in the internalization process, Caco-2 cells were pre-treated with the endocytosis inhibitors chlorpromazine (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or filipin III (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  prior to the addition of labelled-MVs. Control cells were not treated with the inhibitors.

MV internalization was assessed by confocal fluorescence microscopy as previously described [28,37]. Briefly, Caco-2 cells were grown in an 8-well chamber slider (ibidi) and incubated with rhodamine B-R18-labelled MVs (1  $\mu\text{g}$ ) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 h, and then washed with PBS. Nuclei were labelled with DAPI. To visualize cell boundaries, the peripheral zonula occludens ZO-1 protein was stained using anti-ZO-1 rabbit IgG antibody (Invitrogen) and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen). Confocal microscopy was carried out using a Leica TCS SP5 laser scanning confocal spectral microscope with a 63x oil immersion objective lens. Images were captured with a Nikon color camera (16 bit). Fluorescence was recorded at 405 nm (blue; DAPI), 488 nm (green; Alexa Fluor 488), and 546 nm (red; rhodamine B-R18). Z-stack images were taken at 0.5  $\mu\text{m}$ . Images were analyzed using the Fiji image processing package.

For flow cytometry analysis, MVs were labelled with 1% (v/v) fluorescence dye 3–3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate (DiO; Molecular Probes) as described elsewhere [38]. Caco-2 cells grown to confluence in 12-well tissue culture plates were trypsinized, resuspended in fresh DMEM without phenol red, and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  with Dio-labelled MVs (100  $\mu\text{g}$ ) for up to 4 h. To estimate the proportion of internalized MVs, extracellular vesicle fluorescence was quenched with trypan blue (0.25%). This treatment allows detection of only intracellular MVs [38]. At the indicated times, samples were taken and fluorescence intensities were measured using a Beckman Coulter Cytomics FC500 flow cytometer before (total amount of cell-

associated MVs) and after (internalized MVs) the addition of trypan blue. Cell debris and dead cells were excluded from analysis by gating cells using FSC vs SSC double dot. A total of 10,000 events were analyzed for each gated sample. Mean fluorescence intensity values of untreated cells were subtracted from the values of MV-treated cells.

**Cell viability assay.** The trypan blue exclusion test was used to evaluate the effect of MVs on cell viability as described previously [37]. Caco-2 cells plated into 24-well plates were exposed to 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  MVs for up to 168 h. As a rule, once every two days, the cells were trypsinized, stained with 0.25% w/v trypan blue, and counted with a haemocytometer.

## Results

### A *tolR* mutation in EcN increases MV production

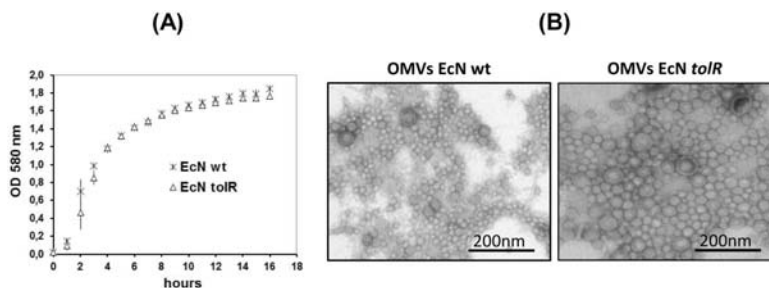
The Tol-Pal system of *E. coli* is important for the maintenance of outer membrane integrity. It has been described that mutations in any of the *tol-pal* genes confer a defect in the outer membrane that leads to increased MV production [19–21].

To improve the MV yield of the probiotic EcN, we constructed a derived *tolR* defective mutant by P1 transduction. The donor *E. coli* strain was TPS300, which carries a  $\text{Cm}^r$  cassette insertion in the *tolR* gene (*tolR:: $\Omega\text{cm}$* ) [30]. The mutation was confirmed by PCR (S1 Fig). To analyze the effect of the *tolR* mutation on cell growth and viability, growth curves of the wild-type and mutant strains in LB were measured, and their log-phase doubling times were calculated. Growth was monitored both by measuring the OD at 580 nm (Fig 1A) and counting viable cells on LB agar plates (S2 Fig). EcN *tolR* exhibited a slightly higher doubling time (23.3 min) than the wild-type EcN strain (19.3 min). However, no differences between strains were observed in the early stationary phase. The vesiculation levels of EcN and EcN *tolR* were compared after 15 h of growth, when both strains achieved an  $\text{OD}_{580}$  of 1.7 and cell counts of  $4 \times 10^9$  CFU/ml. MVs were isolated from cell-free culture supernatants and evaluated by negative stain-TEM. Images showed spherical MVs, which in the wild-type strain ranged in size from approximately 20 to 60 nanometers in diameter (Fig 1B). The *tolR* mutant MVs appeared to be larger (from 20 to 150 nm) and displayed greater variability in size, with a lower population of small MVs (Fig 1B).

MV production was estimated by three different methods: protein quantification, LPS concentration, and fluorescence measured after incubation with the lipid probe FM4-64. Protein and LPS were normalized for the volume of the culture from which MVs were isolated (1L), and fluorescence was normalized for the amount of bacteria (CFU). Results of MV quantification are shown in Table 1. All the three methods, revealed statistically significant differences in vesiculation between the mutant and the wild-type strains, with 32.9-, 51.95- and 77.78-fold increases for protein, LPS and fluorescence determinations, respectively. Although the protein content was higher in the *tolR* mutant, the lipidic content was far higher, and the protein to fluorescence ratio for wild-type and mutant strains gave values of 362.54 and 157.48, respectively.

### Protein profiles of MVs produced by EcN and EcN *tolR*

To further characterize the MVs isolated from the EcN *tolR* mutant, the protein profile was compared to the wild-type EcN strain by SDS-PAGE (Fig 2A). Most of the protein bands were invariably present in both samples, although some differences were observed. Seven differential protein bands were excised from the gel, subjected to in-gel trypsin digestion and analyzed by LC-MS/MS (S1 Table). The name of the protein displaying the highest score in each band is indicated in Fig 2B. The results showed that the most relevant differences were correlated with disturbances in outer membrane structures. MVs isolated from the *tolR* mutant were



**Fig 1. Effect of a *tolR* mutation on EcN growth and vesicle size.** (A) Growth curves of wild-type EcN (cross) and EcN *tolR* (triangles) cultivated in LB medium. Values are means  $\pm$  standard error from three independent experiments. (B) Negative staining electron microscopy of MVs released by these strains after 15 h growth in LB. For both strains, MVs were collected from a 1-litre culture and resuspended in a final volume of 0.2 ml. Representative images of MV samples from wild-type EcN (direct inspection) and EcN *tolR* (1:20 dilution) are shown. Scale bars: 200 nm.

doi:10.1371/journal.pone.0169186.g001

enriched in the peptidoglycan-associated lipoprotein Pal and TolB (bands 4 and 7), but deficient in flagellin and the murein-interacting protein MipA (bands 1 and 3). In both EcN and EcN *tolR* MVs the three main protein bands, close to the 40 kDa marker, corresponded to the outer membrane proteins OmpC, OmpF, NmpC and OmpA. However, the protein displaying the lowest molecular mass (mainly OmpA) was diminished in the wild-type MVs (band 6).

We also performed Western blot analyses of LPS in both MV samples (Fig 2C). At equal protein amounts, the LPS content of EcN *tolR* MVs was higher than that of the wild-type MVs. These results were consistent with the LPS concentration values calculated by the Purpald method (Table 1).

### High resolution TEM of EcN and EcN *tolR*

To evaluate whether mutation in the Tol-Pal complex induced changes in the ultra-structure of EcN and its MVs, EcN and EcN *tolR* strains were examined by TEM following HPF-FS. Analysis of TSA solid cultures revealed important differences in the amount and morphology of MVs released into the extracellular space. For EcN, few MVs were observed between cells (Fig 3A, arrows), while in sections of EcN *tolR* a huge amount of spherical structures appeared, mainly interspersed among cells (Fig 3B, arrows), confirming its hypervesiculating phenotype. After examining 30 fields in sections from wild-type and mutant strains in two replicates, the

**Table 1. MV production of EcN and EcN *tolR* strains determined by three methods.**

	EcN	EcN <i>tolR</i>	$\Delta$ MVs
Protein <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.03	13.01 $\pm$ 1.42	32.9* $\pm$ 7.04
LPS <sup>b</sup>	0.11 $\pm$ 0.04	5.20 $\pm$ 2.04	51.95* $\pm$ 29.72
RFU/CFU <sup>c</sup>	1.16 E-03 $\pm$ 3.7 E-04	8.26 E-02 $\pm$ 8.5 E-03	77.78* $\pm$ 22.03

Values are the means  $\pm$  standard error from three independent experiments.

<sup>a</sup> expressed as mg/L culture

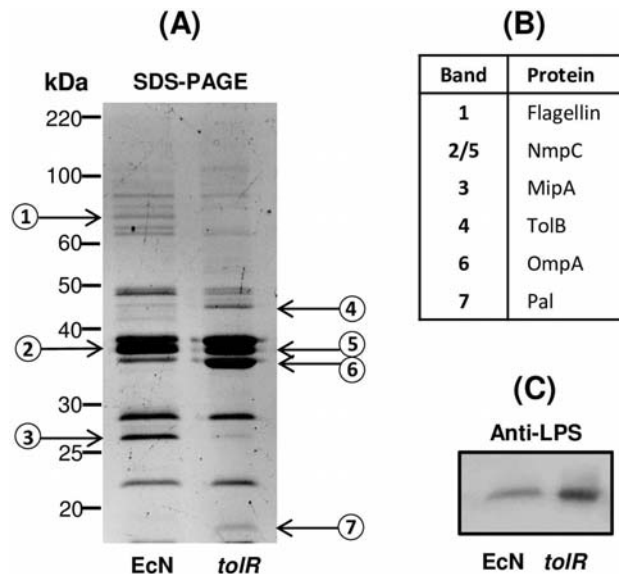
<sup>b</sup> expressed as mmol KDO/L culture

<sup>c</sup> MVs lipid fluorescence was measured after incubation with FM4-64, and expressed as relative fluorescence units (RFU)/ by colony forming units (CFU)

$\Delta$  MVs, means increase in EcN *tolR* vesicle production relative to EcN.

\* differences are statistically significant ( $p < 0.05$ ) according to Krustal-Wallis H test.

doi:10.1371/journal.pone.0169186.t001



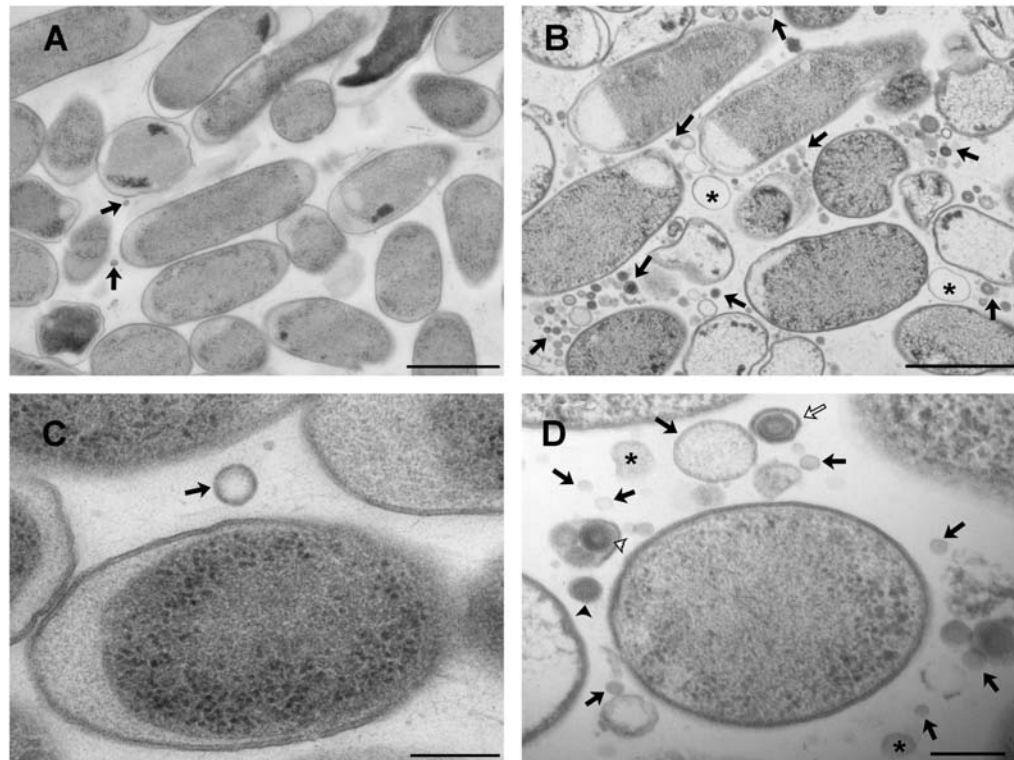
**Fig 2. Protein profile and immunoblotting of LPS of MVs isolated from EcN and EcN *tolR* strains.** (A) Comparison of the protein profile of MVs from EcN and EcN *tolR*. Isolated vesicles (10 µg protein) were separated in a 10%-SDS-PAGE gel and stained with Sypro® Ruby Protein Gel Stain. Molecular size markers are indicated. Seven protein bands (labelled by numbers) were excised from the gel and analyzed by LC-MS/MS (data from these analyses are provided in S1 Table). (B) The name of the protein with the highest score is indicated for each band. (C) Western blot analysis of LPS in MVs isolated from EcN and EcN *tolR* strains. MV samples (0.1 µg protein) were separated in a 15%-SDS-PAGE gel and analysed with specific anti-*E. coli* LPS antibodies. Representative SDS-PAGE and blots from three independent experiments are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0169186.g002

number of MVs in each field was quantified using markers from the software ImageJ-win64, and the mutant strain was found to produce  $94.7 \pm 27.4$ -fold more MVs than the wild-type strain.

The morphology of MVs differed notably between the strains. Most of those produced by EcN corresponded to the commonly named outer membrane vesicles (OMVs). Deriving from the cell outer membrane, OMVs are surrounded by a bilayer membrane and entrap cytoplasmic content, and have diameters smaller than 200 nm (Fig 3C, arrow heads). However, the EcN *tolR* mutant produced different types of MVs: some corresponded to the OMV type, with a normal variation in diameter between 20 and 200 nm (Fig 3D, arrows), but several atypical MVs were also detected. One type contained two bilayers, similarly to the outer-inner membrane vesicles (O-IMVs) previously described by our group [26] (Fig 3D, black arrow head). Another type showed three concentric bilayers (Fig 3D, white arrow). An additional singularity was the presence of small groups of between two and four MVs surrounded by a bilayer (Fig 3D, white arrow head). The diameter of the EcN *tolR* MVs was more variable and on average slightly bigger than that of EcN MVs. In some of the fields, larger (about 400 nm) and apparently empty MVs also appeared, which may correspond to re-annealed membranes from lysed cells (Fig 3B, asterisks). Additionally, fragments of bilayer membranes, partially circularized but not closed, were observed (Fig 3D, asterisks).

TEM observation of sections obtained after HPF-FS also revealed differences in cell morphology between EcN and EcN *tolR*. For EcN *tolR*, a high number of altered cells with variable



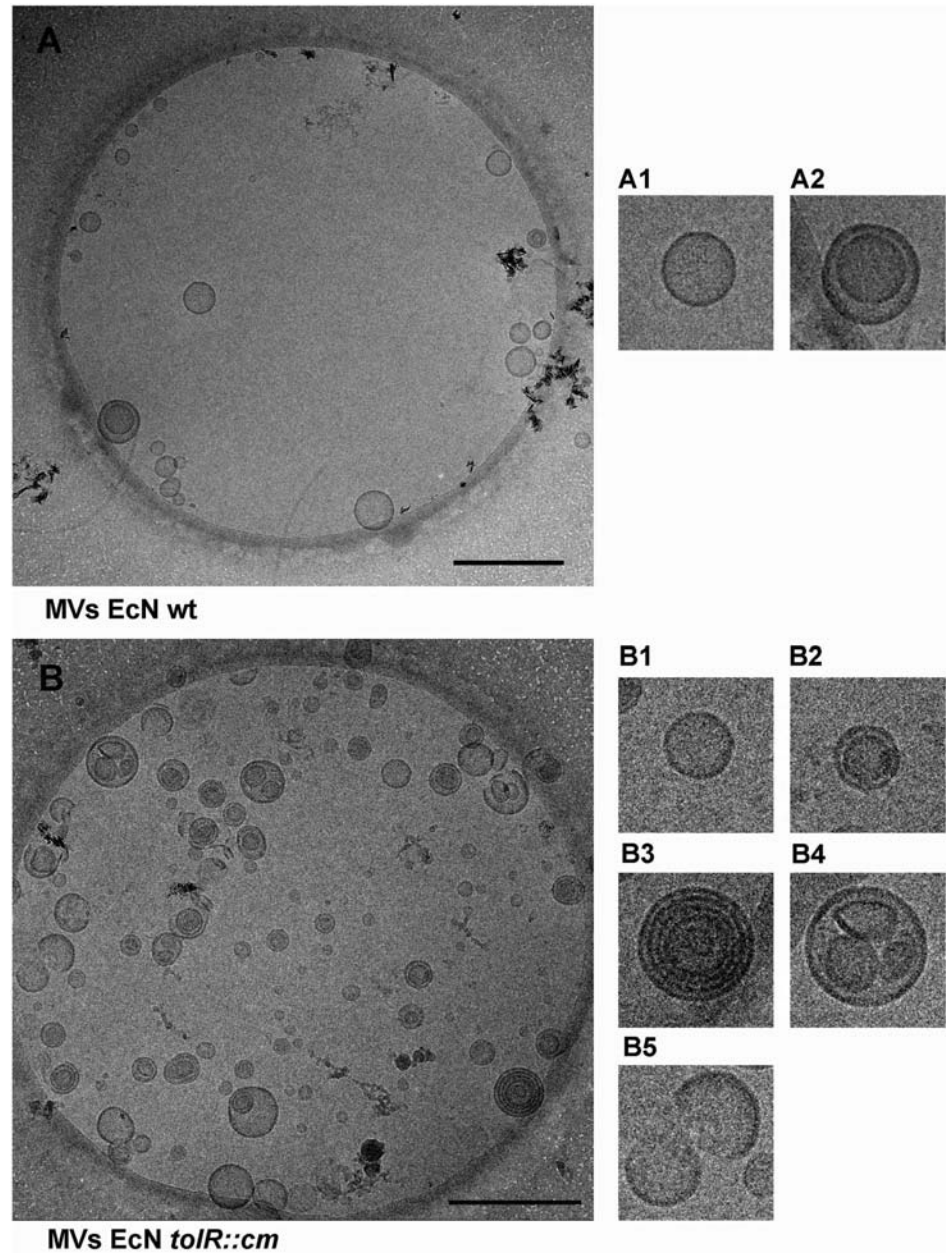
**Fig 3. TEM micrographs of ultrathin sections from EcN and EcN *tolR* strains prepared by HPF-FS. (A)** A representative micrograph of EcN cells in which few MVs are observed (arrows). **(B)** A representative micrograph of EcN *tolR* cells in which a huge amount of MVs can be observed interspersed among cells (arrows). Asterisks indicate bigger empty vesicles. **(C)** A magnified view of EcN cells in which a common OMVs with one bilayer is observed (arrow). **(D)** A magnified view of EcN *tolR* cells in which the following types of MVs are seen: common MVs (OMVs) indicated by black arrows; two bilayer vesicles (O-IMVs) by black arrow heads; multi-layered vesicles by white arrow heads; grouped vesicles by white arrow heads, and partially circularized membranes by asterisks. Representative images of thin-sections from two different experiments are shown. Bars A–B are 1  $\mu$ m, C–D are 200 nm.

doi:10.1371/journal.pone.0169186.g003

morphology were perceived, including length, diameter and cell shape. Such differences have also been reported for *tolR* mutants of other Gram-negative bacteria [20,39,40].

### Cryo-TEM of MVs from EcN and EcN *tolR*

To further characterize MV structure, cryo-TEM analysis was performed. For this purpose, total MVs from both strains were isolated from liquid cultures, and the higher diversity in the types of MVs produced by EcN *tolR* was confirmed (Fig 4). In EcN samples (Fig 4A), single-bilayer OMVs predominated in all observed fields (Fig 4, A1), but double-bilayer vesicles (O-IMVs) (Fig 4, A2) were occasionally detected, as in the previous HPF-FS TEM observations. In contrast, EcN *tolR*-derived MVs analyzed by cryo-TEM showed a range of MV types, many of which did not correspond to the common OMVs or O-IMVs model (Fig 4B). In addition to OMVs (Fig 4, B1) and O-IMVs (Fig 4, B2), multilayered MVs were often observed (Fig 4, B3), as well as small groups of MVs surrounded by a bilayer (Fig 4, B4), and fragments of partially circularized bilayer membranes (Fig 4, B5). Altogether, the electron and cryo-electron



**Fig 4. Isolated MVs from EcN and EcN *tolR* strains observed by cryo-TEM.** (A) A representative image of EcN MVs, in which two types of MVs can be seen. The most abundant correspond to common OMVs (magnified view A1). A few of the recently described MVs named O-IMVs (magnified in view A2) were also observed. (B) A representative image of EcN *tolR* MVs showing different vesicle types. Magnified views are shown on the right: (B1) common OMVs; (B2) O-IMVs; (B3) multi-layered vesicles; (B4) grouped vesicles; (B5) partially circularized membranes. Representative images of plunge-frozen MVs from two different batches of MVs isolated from each strain are shown. Scale bars: 500 nm.

doi:10.1371/journal.pone.0169186.g004

microscopy studies confirmed the existence of substantial heterogeneity in the structure of MVs from the EcN *tolR* mutant.

### EcN *tolR*-derived MVs are not cytotoxic

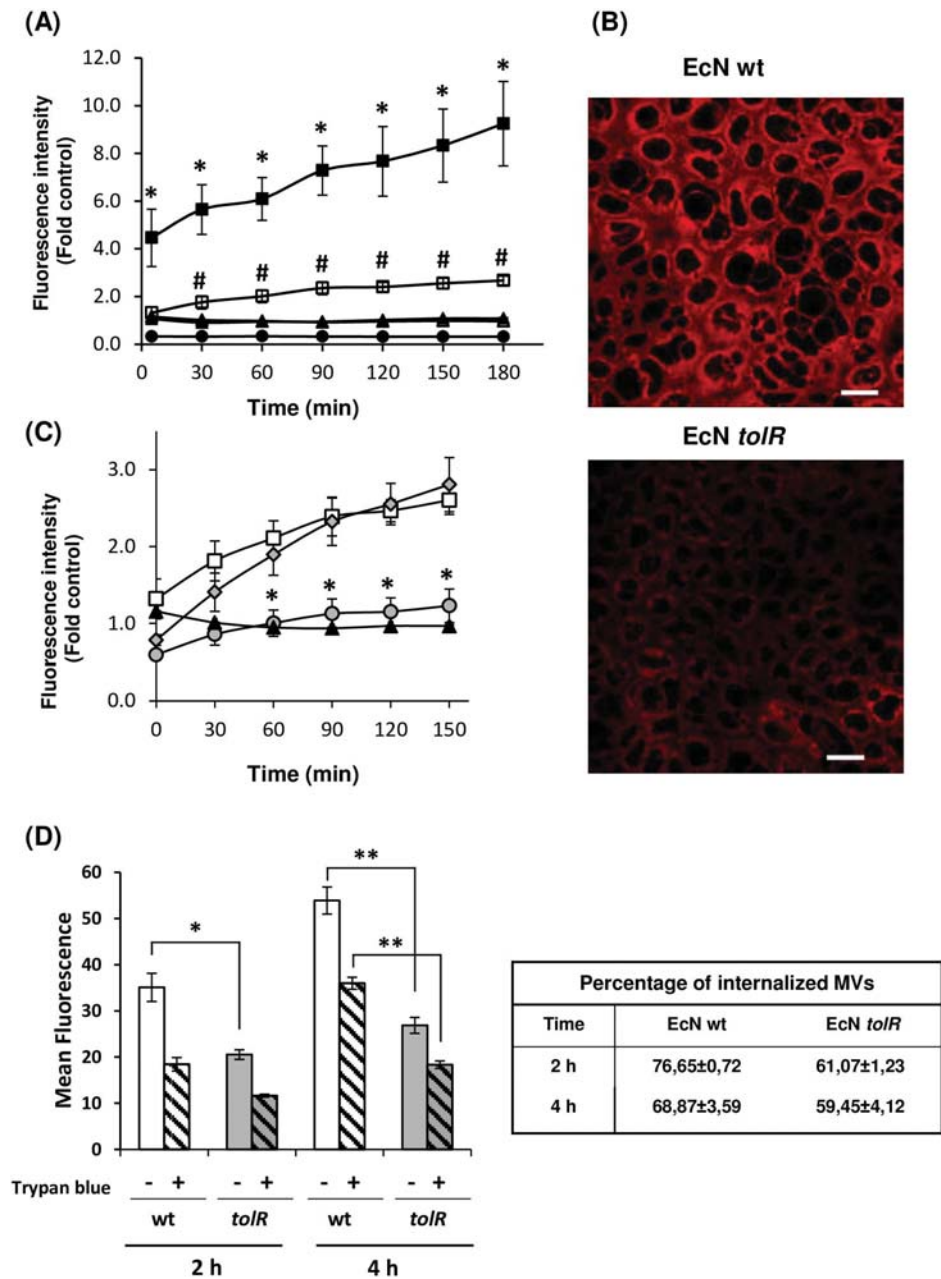
MVs produced by EcN are not cytotoxic to HT-29 cells [37]. To test whether the different vesicular structures produced by the *tolR* mutant could affect cell viability, we examined the impact of EcN *tolR*-derived MVs on Caco-2 cell growth. To this end, kinetic studies were performed in Caco-2 cells exposed to EcN *tolR* MVs (5 µg/ml) or EcN MVs (as a control) for up to 168 h. Cell numbers were calculated by trypan blue exclusion assays carried out every second day during the experiment. Results showed that cell viability was not altered by treatment with EcN *tolR* MVs. No significant differences in the percentage of viable cells were observed after exposure to MVs compared to untreated controls during the incubation period, which was between 95% and 99% in all cases (S3 Fig).

### Uptake of EcN- and EcN *tolR*-derived MVs by intestinal epithelial cells

We have recently shown that EcN MVs are internalized in Caco-2 cells [28,37]. The presence of several types of MV structures in the samples isolated from the mutant strain EcN *tolR* prompted us to analyze whether this heterogeneous population of MVs could be internalized by Caco-2 cells. To this end, MVs were labelled with rhodamine B-R18, whose fluorescence is quenched when intercalated into bilayer membranes at a high concentration. However, this dye fluoresces when diluted upon membrane fusion and internalization. As expected, no changes in fluorescence emission were observed in non-treated cells or samples containing only labelled MVs, whereas rhodamine B-R18-labelled EcN MVs (1 µg protein/well) applied to the apical side of differentiated Caco-2 cells produced a time-dependent increase in fluorescence. Interestingly, the fluorescence level observed in cells incubated with an equal amount of EcN *tolR* MVs was significantly lower (Fig 5A; #  $p < 0.02$ ). Confocal fluorescence microscopy analysis confirmed a reduced uptake by Caco-2 cells of the EcN *tolR*-derived MVs. Immunostaining of the peripheral membrane-associated protein ZO-1 was performed as an epithelial cell membrane marker (S4 Fig). Representative images captured under the same laser intensity for internalized EcN and EcN *tolR* vesicles after 1 h incubation with an equal amount of rhodamine B-R18-labelled MVs are shown in Fig 5B. Previous studies performed in several epithelial cell lines showed that MVs from wild-type EcN enter intestinal epithelial cells through clathrin-mediated endocytosis [37]. To check whether this endocytic pathway is also responsible for the uptake of EcN *tolR*-derived MVs, time-course internalization experiments using rhodamine B-R18-labeled MVs were performed in Caco-2 cells in the presence of inhibitors of endocytosis pathways. MV internalization was not reduced by disruption of lipid raft microdomains and caveolae by filipin III, but was drastically inhibited by chlorpromazine, an inhibitor of the clathrin-mediated pathway (Fig 5C). Thus, in spite of the heterogeneity in MVs produced by the *tolR* mutant, the entry pathway does not differ from that of wild-type MVs. As for EcN MVs, internalization of MVs from EcN *tolR* by undifferentiated Caco-2 cells was also specifically inhibited by chlorpromazine, but not by filipin III (not shown).

To confirm the different capacity of wild-type and *tolR*-derived MVs to become internalized by Caco-2 cells, we carried out flow cytometry experiments using MVs labelled with the fluorescent membrane dye DiO, which has different fluorescence properties from the lipophilic dye rhodamine B-R18. To distinguish internalized from cell surface-bound MVs, extracellular DiO-MV fluorescence was quenched with trypan blue. Results presented in Fig 5D show that DiO-labelled MVs from both strains were bound and internalized in Caco-2 cells in a time-dependent manner. However, the ability of MVs to bind and enter epithelial cells differed





**Fig 5. MV uptake by Caco-2 cells.** (A) Rhodamine B-R18-labeled MVs (1 µg protein) from EcN (closed squares) or EcN *tolR* (open squares) were applied to polarized Caco-2 cells and fluorescence was measured over time. Caco-2 cells (circles) and MVs (triangles) alone were used as controls of background fluorescence. Values are means ± standard error from three independent experiments. Statistical differences were assessed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. \*  $P < 0.02$ , cells incubated with labeled MVs versus the background fluorescence emitted by MVs alone; #  $P < 0.02$ , cells

incubated with EcN *tolR*-derived MVs *versus* cells incubated with EcN MVs. **(B)** Visualization of internalized MVs by fluorescence microscopy. Caco-2 cells were incubated with rhodamine B-R18-labeled MVs for 1 and 3 h at 37°C. Internalized rhodamine B-R18-labeled MVs are visualized in red. Analysis was performed in a Leica TCS SP5 laser scanning confocal spectral microscope with a 63x oil immersion objective lens, and images were captured with a Nikon color camera (16 bit). Scale bars: 20  $\mu$ m. **(C)** Internalization of EcN *tolR*-derived MVs in the presence of endocytosis inhibitors. Caco-2 cells were pre-incubated for 1 h at 37°C with the lipid raft disrupting agent filipin III (gray diamonds) or with the clathrin-mediated endocytosis inhibitor chlorpromazine (gray circles) before adding rhodamine B-R18-labeled OMVs (1  $\mu$ g/well) from the EcN *tolR* mutant. Uptake experiments were performed in the absence of endocytosis inhibitors for comparison (open squares). Fluorescence intensity was normalized by fluorescence detected at the indicated time points by labeled MVs in the absence of cells (black triangles). Data are presented as means  $\pm$  standard error from three independent experiments. Statistical differences were assessed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. Values significantly different from those of cells incubated with MVs in the absence of endocytosis inhibitors are indicated by an asterisk (\* $p$ <0.02). **(D)** Caco-2 cells were incubated with DiO-labeled OMVs (100  $\mu$ g/ml protein) from strains EcN and EcN *tolR* for the indicated times and fluorescence was measured using a flow cytometer before (total cell-associated OMVs) and after (internalized OMVs) trypan blue quenching. Data are expressed as means of fluorescence intensities from 10,000 cells after subtraction of background fluorescence of cells without OMVs (means  $\pm$  standard error from three independent experiments). Statistical differences were assessed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. Significance between cells incubated with EcN *tolR*-derived MVs *versus* cells incubated with EcN MVs (\* $p$ ≤0.02; \*\* $p$ ≤0.002). The table on the right shows the percentage of internalized MVs for each sample and incubation time (internalized / total cell-associated MVs).

doi:10.1371/journal.pone.0169186.g005

significantly between wild-type and *tolR* strains. The mean fluorescence intensities after 2 h and 4 h incubation were significantly lower for EcN *tolR* vesicles, thus confirming their reduced capacity for epithelial cell entry. Interestingly, the percentage of cell-associated MVs (in the absence of trypan blue) that are internalized (in the presence of trypan blue) did not significantly differ between wild-type and *tolR* MVs (Fig 5D). These results indicate that the lower internalization of EcN *tolR*-derived MVs could be explained by their reduced ability to bind epithelial cell membranes. Notably, even for the wild-type EcN, not all cell-associated MVs were internalized. It has been described that the abilities of MVs to bind and enter epithelial cells depend on the cell line used [41,42]. Studies performed with DiO-labelled MVs from enterohaemorrhagic *E. coli* show a lower proportion of internalized MVs in Caco-2 cells than in other cell lines [42], with fluorescence intensity values comparable to those measured here in Caco-2 cells incubated with EcN MVs.

## Discussion

The study of extracellular vesicles is an ongoing research area, not only in mammalian cells but also in bacteria [43]. MVs are considered intercellular communicosomes, as they act as a mechanism for distance delivery of active compounds between cells. In this context, MVs released by commensal bacteria are foreseen as key players in signaling processes in the intestinal mucosa [4]. Although still few, the reports on microbiota-produced MVs prove that they promote immunomodulatory effects in intestinal epithelial and immune cells, as well as *in vivo* models [28,44]. The ability of bacterial MVs to interact with and enter host cells has prompted the exploration of their potential for novel clinical and biotechnological applications [6,11,45].

As stated above, a major drawback of such applications of bacterial MVs is the very low yield of MVs isolated from *in vitro* cultures. One strategy to overcome this limitation is the use of cell envelope protein mutants with a hypervesiculating phenotype. In this context, mutants in the *tol-pal* system have been constructed in various bacterial species to increase MV production. Although analysis by negative stain-TEM has revealed that MVs released by *tol* mutants display the normal features of bacterial MVs, some differences in the protein content, immunogenicity, and pro-inflammatory properties have been reported for *H. pylori*  $\Delta$ *tolB* and  $\Delta$ *pal* mutants [20]. These findings clearly point to differences in the molecular composition of MVs

isolated from *tol* mutants and call for a more in-depth knowledge of MV structure before their application in functional studies or for biotechnological purposes.

To gain further insight into the molecular structure of MVs released by *tol* system mutants, we used the probiotic strain EcN as a model. MVs from EcN and the derived *tolR* mutant were isolated after 15 h of growth, as functional studies are often performed with MVs collected from overnight cultures (from 12 to 15 h growth) [9,29,42,46–47]. As in *tolR* mutants derived from other Gram-negative bacteria [48], the EcN *tolR* growth curve was similar to that of the wild-type EcN. Although minor differences in the growth rate were observed during the early exponential phase, both strains exhibited equal cell numbers and OD<sub>580</sub> values during the late exponential and early stationary phases. Highly vesiculating phenotypes have been described for many *E. coli tol-pal* mutants [13,19], so it was not surprising that EcN *tolR* exhibited significant increases in MV production compared to the wild-type strain, ranging from 32.9- to 77.8-fold, according to the quantification method. Relative values of vesicle production based on fluorescent lipid measurement were higher than with protein analysis, as reported in other studies [13]. Although the greater amounts of protein, LPS or lipids in the *tolR* mutant could be due to a larger vesicle size, the slight increase in *tolR* MV size observed was not enough to justify the 32.9-fold or higher increases measured with the three methods.

While the protein profile of EcN *tolR*-derived MVs was quite similar to that of the MVs isolated from the wild-type strain, some differences were identified. The most relevant differences correlate with disturbances in the outer membrane structures, likely resulting from TolR deficiency. Thus, MVs released by the *tolR* mutant displayed a higher content of TolB (periplasmic protein) and Pal (outer membrane protein), two proteins of the Tol-Pal complex. As formation of the heteromultimeric protein complex TolQRA-B-Pal is altered as a consequence of TolR deficiency, non-interacting TolB and Pal proteins could then be released through MVs. As for *Gallibacterium anatis tolR* mutants [48], the MVs produced by the EcN *tolR* mutant were enriched in OmpA. This abundant outer membrane protein also contributes (like the Tol-Pal system) to linking PG to the outer membrane. It has been suggested that increased OmpA levels may compensate for the membrane instability in Tol-Pal-deficient strains [48]. On the contrary, both the scaffold protein MipA required for PG biosynthesis and flagellin were underrepresented in EcN *tolR* MVs. A low production of flagella has also been reported for a *H. pylori tolB* mutant, and the released MVs similarly showed specific differences in protein composition with respect to those produced by wild-type *H. pylori*, with about ten proteins absent in those of the mutant strain [20]. Overall, we can conclude that the main alterations in the molecular composition of EcN *tolR*-derived MVs may be attributed to TolR deficiency.

The composition of MVs obtained from *tolR* mutants has been studied by several groups, but the MV structure has generally not been analyzed in detail. TEM observation of negatively stained MVs is the most commonly used technique to assess MV presence and morphology, but it does not provide enough resolution to distinguish between different types of MVs, artifacts, or re-circularized membranes from lysed cells [13,19,22,23,49,50]. Some studies have described vesicle morphology by scanning electron microscopy (SEM) or thin-section TEM of chemically fixed and dehydrated samples at room temperature [14,15,51–53]. However, in both methods the extracellular matter, which includes MVs, has a marked propensity to collapse and be removed during sample preparation [2,54]. Surprisingly, few studies have used TEM of cryo-immobilized specimens by HPF followed by FS, or cryo-TEM to visualize MV samples, although both have proven very useful for observing detailed structures of MVs and their producing strains [26,27,34,55,56].

In this study, when TEM of negatively stained MVs was used to compare structural differences between vesicles from EcN and EcN *tolR*, only a slight increase in the mean diameter of EcN *tolR* vesicles was observed and a lower small vesicle population; no details other than their

spherical shape and size were appreciated with this technique. Conversely, TEM observation of thin-sections of HPF-FS samples from both strains allowed us to visualize the higher MV production by EcN *tolR*, and that different types of MVs were interspersed among cells. The presence of different types of MVs was further confirmed by cryo-TEM observation of plunge frozen-hydrated isolated MVs, which is the less artifactual technique. In EcN samples, two types of MVs were observed, most corresponding to common OMVs and a few to the recently described O-IMVs [26,27]. On the other hand, cryo-TEM of EcN *tolR* samples revealed at least five types of hypothetical MVs. The presence of different types of MVs, including trilayered MVs, or whorled outer membrane fragments, has also been confirmed in an ultrastructural analysis of MVs from *Helicobacter pylori* strain 60190 [52].

The protein / fluorescent lipid ratio did not return the same value for EcN and EcN *tolR* MVs, the *tolR* mutant ratio being less than half that of the wild-type strain. This lack of correlation can be explained by the different types of MVs produced by the *tolR* mutant, in which the protein-to-lipid ratio was not maintained when compared with wild-type MVs. TEM and cryo-TEM observations confirmed both the over-vesiculation phenotype of EcN *tolR* and the variety of shapes of *tolR* MVs. Considering the morphological diversity of MVs, many of which had multilayered lipid bilayers, it seems reasonable that the protein-to-lipid ratio is lower in *tolR* MVs. Analyzing MVs structure by TEM after HPF-FS and cryo-TEM techniques, instead of relying only on electron microscopy of negative stained MVs, allowed us to obtain complementary and more accurate information about the over-vesiculating EcN mutant strain.

Although it cannot be discarded that some cell lysis may have contributed to the high amount of MVs produced by the *tolR* mutant, we can rule out that the over-vesiculation and changes in MV morphology were due to impaired growth or cell lysis, since both strains exhibited normal growth with identical cell counts and OD<sub>580</sub> at the time of vesicle collection. One hypothesis is that MVs from EcN *tolR* are unstable and break easily. Rennelli and co-workers [56] explored this possibility by cryo-TEM and established that only 7.3% of MVs from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 were broken. A similar proportion was observed in EcN mutant MVs, which would not explain the marked increase in vesiculation.

Our study shows that not only can the composition and structure of MVs be modified by mutations in the cell envelope proteins, but their interaction with target cells can also be affected. Analysis of MV uptake, measured by the increase in rhodamine-emitted fluorescence and microscope imaging, indicated a reduced level of internalized vesicles derived from the EcN *tolR* mutant. Quantification of the fluorescence emitted upon internalization in Caco-2 cells allowed us to estimate a roughly 3-fold reduction in the number of intracellular MVs in comparison with wild-type-derived MVs. Interestingly, *tolR*-derived MVs are internalized by the same endocytic pathway as EcN MVs, as their uptake is impaired in the presence of the clathrin-mediated endocytosis inhibitor chlorpromazine. Flow cytometry analysis performed with DiO-labelled OMVs confirmed the lower internalization values for *tolR*-derived MVs. In addition, fluorescence intensity values before and after trypan blue addition allowed us to establish that the low number of internalized MVs was due to a lower cell binding capacity of the *tolR*-derived MVs, rather than a different entry pathway or mechanism. These results suggest that only certain types of MVs, most likely conventional OMVs and O-IMVs, efficiently interact with their target(s) or receptor(s) in the cell membrane, a key step before being taken up by epithelial cells through clathrin-mediated endocytosis.

## Conclusions

High yields in MV production are desirable if the MVs are to be used for functional studies or biotechnological purposes. Independently of the strategy used to increase production yield,

there is a need to obtain a well-defined and uniform pool of MVs. Our study confirms that the introduction of a *tolR* mutation in the probiotic EcN induces a hypervesiculation phenotype. MVs retrieved from the mutant strain showed alterations in composition and in their ability to interact with host cells, which can be explained by significant modifications in MV structure. Production of different types of MVs or outer membrane structures by *tolR* mutants cannot be detected by TEM of negatively stained MVs, although this heterogeneity may have a major impact on MV functionality. This study evidences the need for conducting a detailed structural analysis by high resolution TEM techniques when working with hypervesiculating mutants. This analysis is crucial to improve and standardize the MVs used for therapy purposes.

### Supporting Information

**S1 Fig. PCR confirmation of *tolR* disruption in EcN.** The mutant strain EcN *tolR* was constructed by P1-transduction from *E. coli* strain TPS300 (*tolR::Ωcm*). The correct integration of the *tolR::Ωcm* marker in the EcN genome was assessed by PCR amplification with the primers flanking *tolR* sequences: *FW-tolR* (TGC GCCGGAAGCCGTAGTGG) and *RV-tolR* (CCGCTTGTTTCTCACGCAGT). The size of the amplified products is indicated on the left. The increase in the size of the PCR product in the EcN *tolR* mutant confirms *tolR* disruption by the chloramphenicol cassette as in the donor strain TPS300.

(PDF)

**S2 Fig. Growth curves of EcN (cross) and EcN *tolR* (triangles) cultivated in LB medium monitored by viable counts (colony forming units, CFU/ml).**

(TIF)

**S3 Fig. Effect of EcN and EcN *tolR*-derived OMVs on viability of Caco-2 cells.** Cell viability of Caco-2 cells exposed to OMVs (5 µg/ml) from EcN (blue) or EcN *tolR* (orange) for up to 7 days, measured by the trypan blue exclusion assay. Untreated Caco-2 cells (gray) were analyzed in parallel as a control. Values are means ± standard error from three independent experiments. Lack of statistical differences was confirmed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

(TIF)

**S4 Fig. Visualization of internalized MVs by fluorescence microscopy.** Caco-2 cells were incubated with rhodamine B-R18-labeled MVs, isolated from the indicated strains, for 1 hour at 37°C. The cell membrane was visualized by immunostaining with antibodies against the zonula occludens ZO-1 protein followed by Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Internalized labeled MVs are visualized in red. Representative images from three independent experiments are shown. Scale bars: 20 µm.

(TIF)

**S1 Table. Proteomic analysis by LC-MS/MS.** Identification of gel-excised seven protein bands labelled by numbers in Fig 2, which were differentially expressed between EcN and EcN *tolR*.

(XLSX)

### Acknowledgments

We acknowledge Ardeypharm laboratories for providing strain EcN, and Juan Luis Ramos for strain TPS300. We acknowledge Lucy Brzoska for assistance in preparing the English manuscript. We recognize Eliandre Oliveira and M<sup>a</sup> Antonia Oliveira (Proteomic Platform at The Scientific Park of Barcelona, Spain) for technical support. We also acknowledge the assistance

of Cryo-Electron Microscopy Service at the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona for their technological support.

## Author Contributions

**Conceptualization:** LB JB EM LA.

**Data curation:** LA RG.

**Formal analysis:** CPC RG LA MAC.

**Funding acquisition:** EM LB.

**Investigation:** CPC MAC LA RG.

**Methodology:** LA CPC MAC JB RG EM LB.

**Project administration:** LB JB EM.

**Resources:** LA CPC MAC.

**Supervision:** LB LA.

**Validation:** LA RG CPC.

**Visualization:** LA CPC MAC.

**Writing – original draft:** EM JB LB.

**Writing – review & editing:** LA CPC MAC RG JB EM LB.

## References

1. Kulp A, Kuehn MJ. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol.* 2010; 64: 163–184. doi: [10.1146/annurev.micro.091208.073413](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413) PMID: [20825345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20825345/)
2. Beveridge TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol.* 1999; 181: 4725–4733. PMID: [10438737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10438737/)
3. Mashburn-Warren L, McLean RJ, Whiteley M. Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. *Geobiology.* 2008; 6: 214–219. doi: [10.1111/j.1472-4669.2008.00157.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2008.00157.x) PMID: [18459967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18459967/)
4. Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15: 375–387. doi: [10.1038/nri3837](https://doi.org/10.1038/nri3837) PMID: [25976515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25976515/)
5. Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13: 605–619. doi: [10.1038/nrmicro3525](https://doi.org/10.1038/nrmicro3525) PMID: [26373371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26373371/)
6. Nøkleby H, Aavitsland P, O'Hallahan J, Feiring B, Tilman S, Oster P. Safety review: two outer membrane vesicle (OMV) vaccines against systemic *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *Vaccine.* 2007; 25: 3080–3084. doi: [10.1016/j.vaccine.2007.01.022](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.022) PMID: [17287053](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17287053/)
7. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14: 195–208. doi: [10.1038/nri3622](https://doi.org/10.1038/nri3622) PMID: [24566916](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24566916/)
8. van der Pol L, Stork M, van der Ley P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Bio-technol J.* 2015; 10: 1689–1706. doi: [10.1002/biot.201400395](https://doi.org/10.1002/biot.201400395) PMID: [26912077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26912077/)
9. Chen DJ, Osterrieder N, Metzger SM, Buckles E, Doody AM, DeLisa MP, et al. Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 3099–3104. doi: [10.1073/pnas.0805532107](https://doi.org/10.1073/pnas.0805532107) PMID: [20133740](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20133740/)
10. Gujrati V, Kim S, Kim SH, Min JJ, Choy HE, Kim SC, et al. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy. *ACS Nano.* 2014; 8: 1525–1537. doi: [10.1021/nn405724x](https://doi.org/10.1021/nn405724x) PMID: [24410085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24410085/)
11. Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol.* 1995; 177: 3998–4008. PMID: [7608073](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7608073/)

12. Henry T, Pommier S, Journet L, Bernadac A, Gorvel JP, Llobès R. Improved methods for producing outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Res Microbiol.* 2004; 155: 437–446. doi: [10.1016/j.resmic.2004.04.007](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.007) PMID: [15249060](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15249060/)
13. McBroom AJ, Johnson AP, Vemulapalli S, Kuehn MJ. Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J Bacteriol.* 2006; 188: 5385–5392. doi: [10.1128/JB.00498-06](https://doi.org/10.1128/JB.00498-06) PMID: [16855227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16855227/)
14. McBroom AJ, Kuehn MJ. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol.* 2007; 63: 545–558. doi: [10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x) PMID: [17163978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17163978/)
15. Deatherage BL, Lara JC, Bergsbaken T, Rassoulian Barret SL, Lara S, Cookson BT. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol Microbiol.* 2009; 72: 1395–1407. doi: [10.1111/j.1365-2958.2009.06731.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06731.x) PMID: [19432795](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19432795/)
16. Sonntag I, Schwarz H, Hirota Y, Henning U. Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J Bacteriol.* 1978; 136: 280–285. PMID: [361695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/361695/)
17. Song T, Mika F, Lindmark B, Liu Z, Schild S, Bishop A, et al. A new *Vibrio cholerae* sRNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Mol Microbiol.* 2008; 70: 100–111. doi: [10.1111/j.1365-2958.2008.06392.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06392.x) PMID: [18681937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18681937/)
18. Moon DC, Choi CH, Lee JH, Choi CW, Kim HY, Park JS, et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. *J Microbiol.* 2012; 50: 155–160. doi: [10.1007/s12275-012-1589-4](https://doi.org/10.1007/s12275-012-1589-4) PMID: [22367951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22367951/)
19. Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni JC, Raina S, Llobès R. *Escherichia coli tol-pal* mutants form outer membrane vesicles. *J Bacteriol.* 1998; 180: 4872–4878. PMID: [9733690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9733690/)
20. Turner L, Praszkiar J, Hutton ML, Steer D, Ramm G, Kaparakis-Liaskos M, et al. Increased outer membrane vesicle formation in a *Helicobacter pylori tolB* mutant. *Helicobacter.* 2015; 20: 269–283. doi: [10.1111/hel.12196](https://doi.org/10.1111/hel.12196) PMID: [25669590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25669590/)
21. Kulp AJ, Sun B, Ai T, Manning AJ, Orench-Rivera N, Schmid AK, et al. Genome-wide assessment of outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2015; 10: e0139200. doi: [10.1371/journal.pone.0139200](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139200) PMID: [26406465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26406465/)
22. Roier S, Zingl FG, Cakar F, Durakovic S, Kohl P, Eichmann TO, et al. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nat Commun.* 2016; 7: 10515. doi: [10.1038/ncomms10515](https://doi.org/10.1038/ncomms10515) PMID: [26806181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26806181/)
23. Wai SN, Lindmark B, Söderblom T, Takade A, Westermark M, Oscarsson J, et al. Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell.* 2003; 115: 25–35. PMID: [14532000](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14532000/)
24. Studer D, Humbel BM, Chiquet M. Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130: 877–889. doi: [10.1007/s00418-008-0500-1](https://doi.org/10.1007/s00418-008-0500-1) PMID: [18795316](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18795316/)
25. Jensen GJ, Briegel A. How electron cryotomography is opening a new window onto prokaryotic ultrastructure. *Curr Opin Struct Biol.* 2007; 17: 260–267. doi: [10.1016/j.sbi.2007.03.002](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.03.002) PMID: [17398087](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17398087/)
26. Pérez-Cruz C, Carrión O, Delgado L, Martínez G, López-Iglesias C, Mercade E. New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T: implications for DNA content. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79: 1874–1881. doi: [10.1128/AEM.03657-12](https://doi.org/10.1128/AEM.03657-12) PMID: [23315742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23315742/)
27. Pérez-Cruz C, Delgado L, López-Iglesias C, Mercade E. Outer-inner membrane vesicles naturally secreted by gram-negative pathogenic bacteria. *PLoS one.* 2015; 10: e0116896. doi: [10.1371/journal.pone.0116896](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116896) PMID: [25581302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25581302/)
28. Fábrega MJ, Aguilera L, Giménez R, Varela E, Cañas MA, Antolin M, et al. Activation of immune and defense responses in the intestinal mucosa by outer membrane vesicles of commensal and probiotic *Escherichia coli* strains. *Front Microbiol.* 2016; 7: 705. doi: [10.3389/fmicb.2016.00705](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00705) PMID: [27242727](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27242727/)
29. Rosenthal JA, Huang CJ, Doody AM, Leung T, Mineta K, Feng DD, et al. Mechanistic insight into the TH1-biased immune response to recombinant subunit vaccines delivered by probiotic bacteria-derived outer membrane vesicles. *PLoS One.* 2014; 9: e112802. doi: [10.1371/journal.pone.0112802](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112802) PMID: [25426709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25426709/)
30. Sun TP, Webster RE. Nucleotide sequence of a gene cluster involved in entry of E colicins and single-stranded DNA of infecting filamentous bacteriophages into *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1987; 169: 2667–2674. PMID: [3294803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3294803/)

31. Aguilera L, Toloza L, Giménez R, Odena A, Oliveira E, Aguilar J, et al. Proteomic analysis of outer membrane vesicles from the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917. *Proteomics*. 2014; 14: 222–229. doi: [10.1002/pmic.201300328](https://doi.org/10.1002/pmic.201300328) PMID: [24307187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24307187/)
32. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265–275. PMID: [14907713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/)
33. Lee CH, Tsai CM. Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core periodate oxidation. *Anal Biochem*. 1999; 267:161–168. doi: [10.1006/abio.1998.2961](https://doi.org/10.1006/abio.1998.2961) PMID: [9918668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9918668/)
34. Frias A, Manresa A, de Oliveira E, López-Iglesias C, Mercade E. Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted Antarctic bacteria. *Microb Ecol*. 2010; 59: 476–486. doi: [10.1007/s00248-009-9622-9](https://doi.org/10.1007/s00248-009-9622-9) PMID: [20127086](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20127086/)
35. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680–685. PMID: [5432063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5432063/)
36. Egea L, Aguilera L, Giménez R, Sorolla MA, Aguilar J, Badía J, et al. Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39: 1190–1203. doi: [10.1016/j.biocel.2007.03.008](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.03.008) PMID: [17449317](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17449317/)
37. Cañas MA, Giménez R, Fábrega MJ, Toloza L, Baldomà L, Badia J. Outer membrane vesicles from the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and the commensal ECOR12 enter intestinal epithelial cells via clathrin-dependent endocytosis and elicit differential effects on DNA damage. *PLoS One* 2016; 11(8): e0160374. doi: [10.1371/journal.pone.0160374](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160374) PMID: [27487076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27487076/)
38. Parker H, Chitcholtan K, Hampton MB, Keenan JI. Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infect Immun*. 2010; 78(12): 5054–5061. doi: [10.1128/IAI.00299-10](https://doi.org/10.1128/IAI.00299-10) PMID: [20876296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20876296/)
39. Llamas MA, Ramos JL, Rodríguez-Herva JJ. Mutations in each of the *tol* genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability. *J Bacteriol*. 2000; 182(17):4764–4772. PMID: [10940016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10940016/)
40. Dubuisson J-F, Vianney A, Hougouvioux-Cotte-Pattat N, Lazzaroni J. Tol-Pal proteins are critical cell envelope components of *Erwinia chrysanthemi* affecting cell morphology and virulence. *Microbiology* 2005; 151:3337–3347. doi: [10.1099/mic.0.28237-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.28237-0) PMID: [16207916](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16207916/)
41. Kunsmann L, Rüter C, Bauwens A, Greune L, Glüder M, Kemper B, et al. Virulence from vesicles: novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. *Sci Rep*. 2015; 5:13252. doi: [10.1038/srep13252](https://doi.org/10.1038/srep13252) PMID: [26283502](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26283502/)
42. Bielaszewska M, Rüter C, Kunsmann L, Greune L, Bauwens A, Zhang W, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin employs outer membrane vesicles to target mitochondria and cause endothelial and epithelial apoptosis. *PLoS Pathog*. 2013; 9: e1003797. doi: [10.1371/journal.ppat.1003797](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003797) PMID: [24348251](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24348251/)
43. Yoon YJ, Kim OY, Gho YS. Extracellular vesicles as emerging intercellular communicasomes. *BMB Rep*. 2014; 47: 531–539. doi: [10.5483/BMBRep.2014.47.10.164](https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.10.164) PMID: [25104400](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25104400/)
44. Shen Y, Giardino Torchia ML, Lawson GW, Karp CL, Ashwell JD, Mazmanian SK. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host Microbe*. 2012; 12: 509–520. doi: [10.1016/j.chom.2012.08.004](https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.004) PMID: [22999859](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22999859/)
45. Nieves W, Petersen H, Judy BM, Blumentritt CA, Russell-Lodrigue K, Roy CJ, et al. A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides protection against lethal sepsis. *Clin Vaccine Immunol*. 2014; 21: 747–754. doi: [10.1128/COI.00119-14](https://doi.org/10.1128/COI.00119-14) PMID: [24671550](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24671550/)
46. Kesty NC, Mason KM, Reedy M, Miller SE, Khuen MJ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J*. 2004; 23: 4538–4549. doi: [10.1038/sj.emboj.7600471](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600471) PMID: [15549136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15549136/)
47. Bielig H, Rompikuntal PK, Dongre M, Zurek B, Lindmark B, Ramstedt M, et al. NOD-like receptor activation by outer membrane vesicles from *Vibrio cholera* non-O1 non-O139 strains is modulated by the quorum-sensing regulator HapR. *Infect Immun*. 2011; 79: 1418–1427. doi: [10.1128/IAI.00754-10](https://doi.org/10.1128/IAI.00754-10) PMID: [21263023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21263023/)
48. Bager RJ, Persson G, Nesta B, Soriani M, Serino L, Jeppsson M, et al. Outer membrane vesicles reflect environmental cues in *Gallibacterium anatis*. *Vet Microbiol*. 2013; 167: 565–572. doi: [10.1016/j.vetmic.2013.09.005](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.005) PMID: [24090812](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24090812/)
49. Kolling GL, Matthews KR. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 65: 1843–1848. PMID: [10223967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10223967/)
50. Lee EY, Bang JY, Park GW, Choi DS, Kang JS, Kim HJ, et al. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics*. 2007; 7: 3143–3153. doi: [10.1002/pmic.200700196](https://doi.org/10.1002/pmic.200700196) PMID: [17787032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17787032/)



51. Alves NJ, Turner KB, Daniele MA, Oh E, Medintz IL, Walper SA. Bacterial Nanobioreactors-directing enzyme packaging into bacterial outer membrane vesicles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015; 7: 24963–24972. doi: [10.1021/acsami.5b08811](https://doi.org/10.1021/acsami.5b08811) PMID: [26479678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26479678/)
52. Fiocca R, Necchi V, Sommi P, Ricci V, Telford J, Cover TL, et al. Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J Pathol*. 1999; 188: 220–226. doi: [10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199906\)188:2<220::AID-PATH307>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199906)188:2<220::AID-PATH307>3.0.CO;2-C) PMID: [10398168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10398168/)
53. Ercoli G, Tani C, Pezzicoli A, Vacca I, Martinelli M, Pecetta S, et al. LytM proteins play a crucial role in cell separation, outer membrane composition, and pathogenesis in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *MBio*. 2015; 6: e02575–14. doi: [10.1128/mBio.02575-14](https://doi.org/10.1128/mBio.02575-14) PMID: [25714719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25714719/)
54. Nevot M, Deroncelle V, López-Iglesias C, Bozal N, Guinea J, Mercade E. Ultrastructural analysis of the extracellular matter secreted by the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF3. *Microb Ecol*. 2006; 51: 501–507. doi: [10.1007/s00248-006-9065-5](https://doi.org/10.1007/s00248-006-9065-5) PMID: [16645922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16645922/)
55. Palsdottir H, Remis JP, Schaudinn C, O'Toole E, Lux R, Shi W, et al. Three-dimensional macromolecular organization of cryofixed *Myxococcus xanthus* biofilms as revealed by electron microscopic tomography. *J Bacteriol*. 2009; 191: 2077–2082. doi: [10.1128/JB.01333-08](https://doi.org/10.1128/JB.01333-08) PMID: [19168614](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19168614/)
56. Renelli M, Matias V, Lo RY, Beveridge TJ. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*. 2004; 150: 2161–2169. doi: [10.1099/mic.0.26841-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.26841-0) PMID: [15256559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15256559/)

