



WYDZIAŁ BIOLOGII  
I OCHRONY  
ŚRODOWISKA  
Uniwersytet Łódzki

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 23.07.24
L.dz. 364

Łódź, 11.07.2024 r.

Prof. dr hab. Antoni Różalski  
Katedra Biologii Bakterii  
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Zuzanny Chudzik

pt. „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i lipidomy *Cutibacterium* spp. o potencjale terapeutycznym i diagnostycznym”

Rozprawa doktorska mgr A.Z. Chudzik powstała w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, pod kierunkiem Promotor dr hab. Marioli Paściak, prof. IiITD PAN we Wrocławiu.

W recenzowanej rozprawie doktorskiej sformułowano dwa cele badawcze. Pierwszy to zbadanie wydzielanych przez komórki *C. acnes* pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, ich charakterystyka morfologiczna oraz analiza porównawcza białek i lipidów. Drugi to analiza lipidomu bakterii należących do rodzaju *Cutibacterium* i poszukiwanie specyficznych markerów lipidowych możliwych do wykorzystania w rozróżnianiu poszczególnych gatunków i filotypów tych bakterii. Skoncentrowano się na izolacji i ustaleniu składu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych trzech filotypów *C. acnes*: IA1, 1B i II oraz kompleksowej analizie porównawczej kwasów tłuszczowych i lipidów komórkowych przedstawicieli rodzaju *Cutibacterium*. Kolejnym zadaniem było porównanie lipidomów *Cutibacterium* spp. w celu ustalenia markerów typowych zarówno dla rodzaju *Cutibacterium* jak i dla filotypów *C. acnes*.

Rozprawa doktorska mgr A.Z. Chudzik składa się z trzech publikacji:

Chudzik A., Paściak M. (2020). Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako mediatory komunikacji międzykomórkowej, *Postepy Hig Med Dosw*, 74, 572-588. IF2020=0.27; MEiN= 40 pkt.

Chudzik A., Migdał P., Paściak M. (2022). Different *Cutibacterium acnes* Phylotypes Release Distinct Extracellular Vesicles, *IJMS*, 23(10), 5797. IF2022= 5.6; MEiN= 140 pkt.

Chudzik A., Bromke M.A., Gamian A., Paściak M. (2024). Comprehensive lipidomic analysis of the genus *Cutibacterium*, *mSphere*, May 7:e0005424. doi: 10.1128/msphere.00054-24. IF2022= 4.8 MEiN= 100 pkt.

Uzupełnieniem tych publikacji jest omówienie pracy, na które składa się rozdział poświęcony klinicznemu aspektom rodzaju *Cutibacterium*, prezentacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i ich znaczenia z uwzględnieniem pęcherzyków *C. acnes* oraz rozdział poświęcony lipidom bakteryjnym i możliwościom ich wykorzystania w identyfikacji drobnoustrojów. W omówieniu pracy znalazło się też szczegółowe przedstawienie celu rozprawy, podsumowanie danych zawartych w trzech ww. publikacjach, literatura oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. W rozprawie znalazły się też oświadczenia Doktorantki i współautorów ww. publikacji o ich udziale w ich powstawaniu. Z oświadczeń tych wynika, iż doktorantka ma w nich znaczący udział. Dotyczy to tak pracy przeglądowej, jak i prac doświadczalnych. W przypadku tych ostatnich z wymienionych wykonała większość doświadczeń, ale też brała udział w formułowaniu koncepcji pracy, opracowaniu wyników i ich dokumentacji, przeglądzie literatury, przygotowania manuskryptów i odpowiedzi na recenzje. Współautorzy publikacji to potwierdzają.

Doktorantka w Omówieniu pracy doktorskiej przedstawiła rodzaj *Cutibacterium*, w szczególności *C. acnes*, kliniczne znaczenie tych bakterii w wywoływaniu trądzika pospolitego, ale nie tylko, bo także zakażeń protez stawu barkowego, wsierdzia czy implantów piersi. Wskazała też na inne chorobotwórcze gatunki rodzaju *Cutibacterium* i rodzaje infekcji przez nie wywoływane. Biorąc pod uwagę zwiększającą się liczbę przypadków zakażeń wywoływanych przez te bakterie i ich etiologię ważnym zagadnieniem jest poznanie zróżnicowanie strukturalnego ich lipidów i białek, także w kontekście poszukiwania molekularnych markerów diagnostycznych dla nich specyficznych. Doktorantka w Omówieniu przybliży możliwości wykorzystania lipidów bakteryjnych jako takich markerów oraz podkreśla znaczenie metod lipidomicznych w identyfikacji i różnicowaniu drobnoustrojów, przedstawia też znaczenie lipidów w oddziaływaniach z komórkami gospodarza. W Omówieniu mgr A.Z. Chudzik przedstawia też krótko problematykę związaną z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi, zwracając uwagę na potrzebę pogłębionych badań tych struktur u *C. acnes*. Pracom wchodzących w skład rozprawy w Omówieniu poświęcono różną ilość miejsca. Krótko, co zrozumiacie wspomniano

o artykule przeglądowym, szerzej podsumowano pracę drugą, pracę trzecią też przedstawiono krótko, choć moim zdaniem zasługiwała na dłuższy komentarz.

Praca przeglądowa na temat pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, która Doktorantka opublikowała wspólnie z Promotorką rozprawy doktorskiej, znakomicie teoretycznie wprowadza w problematykę badań w ramach jednego z dwóch tematów doktoratu. Jest to bardzo dobre, kompleksowe opracowanie o tych fragmentach komórek zarówno bakterii, jak i archeonów, a także komórek eukariotycznych. W artykule dokonano przeglądu nazewnictwa tych nanocząstek na tle historii ich badań. Dużą część publikacji poświęcono biogenezie bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. U bakterii Gram-ujemnych wyróżniamy dwa typy pęcherzyków – pierwszy wcześniej poznany, z błoną zewnętrzną jako zwróconym do środowiska elementem strukturalnym i drugi, w którym są obecne obie błony – zewnętrzna i membrana komórkowa. Przedstawiono możliwe sposoby uwalniania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek. U bakterii Gram-ujemnych to rodzaj pączkowania. U bakterii Gram-dodatnich, ze względu na odmienną budowę ściany komórkowej, mechanizm tworzenia pęcherzyków jest inny, wymaga „poluzowania” części sztywnej ściany komórkowej, zbudowanej w wielu warstwach peptydoglikanu. Możliwe sposoby ich uwalniania u tych bakterii scharakteryzowano. Szczegółowo przedstawiono też skład pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i udział w tym składzie białek, lipidów i kwasów nukleinowych. Opisano także możliwe znaczenie pęcherzyków w oddziaływaniach między komórkami bakterii, ich rolę ochronną dla komórek przed działaniem szkodliwych czynników środowiskowych (reaktywne formy tlenu, antybiotyki, bakteriofagi), pozyskiwaniu substancji odżywczych przez wytwarzanie i umiejscawianie w tych strukturach białek, umożliwiających hydrolizę i wiązanie węglowodanów obecnych w przewodzie komórkowym makroorganizmu, zamykanie w pęcherzykach czynników wirulencji patogenów, a także ich rolę w oddziaływaniach antagonistycznych wobec innych bakterii, przez wydzielanie bakteriocyn, wytwarzanie enzymów zdolnych do hydrolizy peptydoglikanu, czy też rozprzestrzenieniu się bakteriofagów. Mogą też zawierać cząstki sygnałowe typowe dla *quorum sensing*, co umożliwia komunikację między bakteriami i ma udział w formowaniu biofilmu. Ważną częścią pracy przeglądowej są rozdziały poświęcone roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w patogenezie zakażeń. Omówiono ten problem na przykładzie bakterii *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter jejuni* i *Escherichia coli* – ETEC. Podano też przykłady oddziaływań pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na układ immunologiczny: negatywnych (m.in. nasilenia wytwarzania cytokin prozapalnych) i

pozytywnych, co przedstawiono na przykładzie probiotycznych bakterii *E. coli* Nissle i *Bifidobacterium bifidum*. Przegląd kończy fragment poświęcony biomedycznym zastosowaniom bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych tj. możliwości ich wykorzystania jako adiuwantów szczepionkowych, a także nośników leków.

Udział Doktorantki w powstaniu przedstawionej wyżej pracy przeglądowej stanowi ważny etap w jej przygotowaniu się do prac doświadczalnych, zapoznania się z literaturą przedmiotu, przesłedzenia metod stosowanych w izolacji i badaniach zewnątrzkomórkowych pęcherzów bakteryjnych. Wykazała się dobrą znajomością literatury. Przegląd informacji zaprezentowanych w tej pracy jak i w Omówieniu rozprawy, świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do podjętych badań eksperymentalnych. Praca przeglądowa opublikowana została w 2020 r., mija więc 4 lata od jej ukazania się. Chciałbym więc zapytać czy z przedstawionych mechanizmów biogenezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych któryś został w pełni potwierdzony doświadczalnie i czy wskazane w artykule możliwości zastosowania pęcherzyków potwierdziły się, a pojawiły się nowe.

Dwie prace oryginalne stanowią część eksperymentalną rozprawy mgr A.Z. Chudzik. W pierwszej z wyżej wymienionych Doktorantka zajęła się analizą pęcherzyków zewnątrzkomórkowych trzech filotypów *C. acnes* typu IA, IB i typu III. Szczepy zaliczane do filotypu IA dominują wśród izolatów od pacjentów z trądzikiem pospolitym, szczepy filotypu IB są izolowane tkanek miękkich, a szczepy zaliczane do filotypu III wywołują infekcje prowadzące do chorób prostaty. Celem szczegółowym badań było porównanie profili białkowych i lipidowych charakterystycznych dla pęcherzyków przedstawicieli tych filotypów oraz zbadania morfologii tych struktur. Charakterystykę morfologii pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przeprowadzono posługując się transmisyjną mikroskopią elektronową, a ich wielkość (średnica cząstek) mierzono przy pomocy analizatora wykorzystującego dynamiczne rozpraszanie światła. Średnie wielkości pęcherzyków o sferycznej strukturze mieściły się przedziale wartości 80,15-93,8 nm. W analizie profili białkowych badanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wykorzystano elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w środowisku SDS w warunkach denaturujących – SDS-PAGE. Profile białkowe pęcherzyków zewnątrzkomórkowych trzech filotypów *C. acnes* porównano z białkami powierzchniowymi, białkami cytozolu oraz białkami ściany komórkowej i lizatów komórek. Ważnym osiągnięciem tych badań było wykazanie, iż profile białkowe pęcherzyków zewnątrzkomórkowych trzech filotypów tych bakterii różnią się. W profilu białek bakterii typu IB stwierdzono obecność niewielu białek, podobnie jak w innych badanych frakcjach białkowych z tych bakterii. Inaczej, pęcherzyki błonowe bakterii typu IA

były bogate w białka, a niektóre spośród nich stwierdzono też w lizatach komórkowych, cytozolu i ścianie komórkowej. Podobnie, białka typowe dla pęcherzyków bakterii typu II odnaleziono też wśród białek cytozolu. Ekstrakty lipidowe pęcherzyków zewnątrzkomórkowych trzech filotypów *C. acnes* otrzymane po potraktowaniu bakterii mieszaniną metanol-chloroform i oczyszczeniu, poddano analizie z wykorzystaniem dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym, a lipidy ujawniano z wykorzystaniem siarczanu miedzi. W badaniach lipidomicznych zastosowano też MALDI-TOF. Ujawniono fosfo- i glicerolipidy. Wykazano różnice w profilach lipidowych, tak pomiędzy ekstraktami otrzymanymi z pęcherzyków, jak i ekstraktami pochodzącymi z lizatów komórkowych odmiennych filotypów. Analiza lipidów z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF wykazała, iż ekstrakty lipidów z komórek zawierały ich większą ilość, w porównaniu do lipidów z pęcherzyków. Analiza wyników uzyskanych za pomocą MALDI-TOF pozwoliła też na wskazanie lipidów wspólnych oraz specyficznych dla pęcherzyków z poszczególnych filotypów *C. acnes*. Podsumowując, w pierwszej pracy na podkreślenie zasługuje porównanie po raz pierwszy występujących w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych białek i lipidów oraz wykazanie różnic w ich składzie w zależności od filotypu *C. acnes*. Autorzy w konkluzji napisali, iż wyniki badań zawarte w tej pracy stanowią podstawę do dalszych analiz nanostruktur, w kontekście wykorzystania ich jako nośników leków i wytwarzania szczepionek. Nawiązując do tego stwierdzenia, chciałbym zapytać Doktorantkę o dalszy plan badań w tym zakresie i może wskazanie jakie konkretne leki mogłyby być „zamykane” w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych i na ile pęcherzyki te mogłyby stanowić szczepionki chroniące przed infekcją, czy też rozwojem infekcji *C. acnes*.

W drugiej pracy skoncentrowano się na analizie lipidomicznej bakterii z rodzaju *Cutibacterium*. Jej celem była nie tylko porównawcza analiza lipidów przedstawicieli tego rodzaju, ale też analiza ich kwasów tłuszczowych. Badano pod tym względem bakterie filotypów *C. acnes* IA1 IB, II i III, a także dwóch szczepów *C. granulosum* i po jednym szczepie *C. avidum* i *C. nanmetense*. Bakterie poddawano kwaśnej metanolizie i działaniu mieszaniny wody i heksanu (FEME analysis – fatty acid methyl ester analysis) i analizowano z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej z spektrometrią masową (GC-MS). Do porównania lipidomu bakteryjnego zastosowano chromatografię cieczową ze spektrometrią mas (LC-MS) w dodatnim i ujemnym trybie jonów. Wykazano podobieństwo w profilu kwasów tłuszczowych ośmiu badanych szczepów rodzaju *Cutibacterium*. Były wśród nich kwasy nasycone C15:0, C16:0 i C17:0. Najwięcej było kwasu *iso*-C15:0 z resztą metylową w odgałęzieniu. Występował on w różnych ilościach w badanych szczepach. Wykryto też kwasy

*iso* i *anteiso* - C17:0 i C16:0, występujące w mniejszej obfitości. Pogrupowania szczepów *Cutibacterium* ze względu na zawartość kwasów tłuszczowych pozwoliło wyodrębnić trzy klastry: I z dwoma szczepami *C. acnes*, szczepami *C. granulosum* i *C. avidum*, II reprezentowany przez dwa szczepy *C. acnes* i jeden szczep *C. granulosum*. Szczep *C. namnetense* zaliczono do klastra trzeciego. Analiza lipidów przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas w dodatnim i ujemnym trybie jonów doprowadziła do wykrycia 90 lipidów w trybie dodatnim i 38 w trybie ujemnym. Analiza ta też pozwoliła wyróżnić lipidy o charakterze markerów dla poszczególnych filotypów *C. acnes*. Wykazano, iż fosfatydylocholina PC 30:0 jest obecna w dużej ilości jedynie w komórkach *C. acnes* filotypu IB; sfingomielinę SM 33:1 zidentyfikowano w komórkach *C. acnes* filotypu II i w komórkach *C. namnetense*, a sfingomielinę SM 35:1 w komórkach *C. acnes* filotypów II i III; fosfatydyloglicerol z podstawnikiem alkiloeterowym PG O-32:0 wykryto tylko w komórkach *C. acnes* filotypu IB. Na szczególne wyróżnienie zasługuje wykazanie po raz pierwszy obecności lipidów należących do klasy amidów kwasów tłuszczowych tj. N-acyloetanolamin (NAE), podstawionych przez atom azotu etanolaminy grupą acylową. Stwierdzono też obecność fosfolipidów z podklasy kardiolipin. Opierając się na wynikach analizy podobieństwa w profilach lipidów wyróżniono dwa klastry typowe dla szczepów rodzaju *Cutibacterium*. Pierwszy z dwoma szczepami *C. granulosum* i jednym *C. avidum*. Drugi z 4 szczepami filotypów *C. acnes*, z dwoma podklastami po dwa szczepy tego gatunku. *C. namnetense* wykazał odmienności w tym zakresie. Te wyniki uzyskano po analizie w dodatnim trybie jonów. Inny obraz wyłonił się po analizie w ujemnym trybie jonów. Wyróżniono klaster szczepów „grupy acnes”. Drugi klaster utworzyły *C. granulosum* i *C. avidum* oraz *C. namnetense*. Ten ostatni z wymienionych gatunków znalazł się też w klastrze głównym razem z „grupą acnes”. Wyniki badań lipidomicznych wskazały na możliwość różnicowania pomiędzy gatunkami rodzaju *Cutibacterium* i filotypami *C. acnes*. Może to być wykorzystane w diagnostyce mikrobiologicznej. Badania opisane w tej lipidomicznej pracy doprowadziły do identyfikacji lipidów wcześniej nie wykrywanych w bakteriach rodzaju *Cutibacterium*.

Dwie przedstawiono przeze mnie wyżej prace oryginalne, podobnie jak i artykuł przeglądowy już opublikowano w czasopiśmie o szerokim zasięgu, były one zapewne recenzowane przez wymagających recenzentów. Podsumowując należy stwierdzić, iż postawiono cele badań odpowiadają zakresowi tematu rozprawy doktorskiej, zastosowano właściwe metody, które pozwoliły Doktorantce zrealizować przyjęty zakres badań. Wyniki jej badań mają dużą wartość poznawczą, znacząco wzbogacając naszą wiedzę o bakteriach z

rodzaju *Cutibacterium*, ale też mogą być w przyszłości wykorzystane w praktyce. Wnioski znajdują potwierdzenie w uzyskanych danych. Doktorantka otrzymała pęcherzyki zewnątrzkomórkowe trzech filotypów *C. acnes* i je scharakteryzowała pod względem morfologii i składu białkowo-lipidowego. Różnice w składzie białek i lipidów pęcherzyków zewnątrzkomórkowych bakterii odmiennych filotypów *C. acnes* pozwoliły Doktorantce na sugestię, iż mogą stanowić antygeny selektywnie indukujące odpowiedź immunologiczną, a tym samym mogą być wykorzystane jako składowe szczepionek. Zbadła też lipidom rodzaju *Cutibacterium*, wskazując, iż wyniki tych badań mogą być zastosowane w projektowaniu nowych narzędzi diagnostycznych.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Zuzanny Chudzik pt. „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i lipidomy *Cutibacterium* spp. o potencjale terapeutycznym i diagnostycznym” spełnia warunki określne w art. 187 ust.1-4 Ustawy „Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce” (Dz.U. 2018, poz 1668 z późn. zm) i zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Antoni Aśialko