Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk



mgr Anna Zuzanna Chudzik

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

Promotor: dr hab. Mariola Paściak, prof. IITD PAN

Niniejsza rozprawa doktorska wykonana została w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

> Wrocław 2024

Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy Polish Academy of Sciences



Anna Zuzanna Chudzik MSc

Extracellular vesicles and lipidomes of *Cutibacterium* spp. with therapeutic and diagnostic potential

Supervisor: dr hab. Mariola Paściak, prof. IIET PAS

This doctoral dissertation has been completed in the Medical Microbiology Laboratory

> Wroclaw 2024

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania

Dr hab. Marioli Paściak za całą przekazaną wiedzę, opiekę mertoryczną, zaufanie, cierpliwość i poświęcony czas

Prof. dr hab. Andrzejowi Gamianowi za cenne konsultacje naukowe i wskazówki w przygotowywaniu manuskryptów

Dr Mariuszowi Bromke za pomoc w badaniach lipidomicznych i analizie danych

Współpracownikom oraz Koleżankom i Kolegom z Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych za okazaną mi życzliwość i pomoc, praca z Wami była prawdziwym przywilejem

szczególnie

Dr Karolinie Filik-Matyjaszczyk za motywację i dzielenie się swoim doświadczeniem

Rodzicom i Narzeczonemu za wsparcie, cierpliwość i wiarę w moje możliwości, bez Was ta praca nie powstałaby

Pracę tę dedykuję mojej Mamie

Zawartość rozprawy doktorskiej

1.	Streszczenie	5
2.	Abstract	7
3.	Omówienie	9
4.	Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy	24
5.	Oświadczenia współautorów	25
6.	Publikacje wchodzące w skład rozprawy	35
7.	Wnioski	.100
8.	Osiągnięcia	.101

Streszczenie

Bakterie z rodzaju *Cutibacterium* należą do względnie beztlenowych drobnoustrojów wchodzących w skład mikrobioty skóry człowieka. Jednocześnie są także oportunistycznymi patogenami i mogą stanowić zagrożenie dla osób z deficytami immunologicznymi. Najważniejszym i zarazem najlepiej opisanym gatunkiem należącym do tego rodzaju jest *Cutibacterium acnes* (dawniej *Propionibacterium acnes*) o udokumentowanej roli w przebiegu trądziku pospolitego. Ze względu na dynamiczny wzrost antybiotykooporności tych drobnoustrojów oraz ich szerokie rozpowszechnienie, niezbędne jest skuteczne zapobieganie zakażeniom *C. acnes* u ludzi oraz precyzyjna diagnostyka.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są sferycznymi nanostrukturami wydzielanymi przez komórki prokariotyczne, które transportują białka, kwasy nukleinowe, metabolity komórkowe, bakteryjne czynniki wirulencji i są mediatorami komunikacji międzykomórkowej. Z tego względu mogą selektywnie stymulować układ immunologiczny gospodarza, co pozwala na wykorzystanie ich jako składników szczepionek.

Celem pracy była kompleksowa analiza lipidomu bakterii należących do rodzaju *Cutibacterium* i poszukiwanie specyficznych markerów lipidowych o potencjale diagnostycznym dla rozróżniania poszczególnych gatunków i filotypów. Zadaniem komplementarnym była szczegółowa analiza wydzielanych przez komórki *C. acnes* pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, obejmująca ich charakterystykę morfologiczną oraz analizę porównawczą profilów białkowych i lipidowych, co umożliwiło przygotowanie platformy badawczej dla potencjalnego zastosowania tych struktur w szczepionkach.

Rozprawę doktorską stanowi cykl trzech powiązanych tematycznie publikacji naukowych: pracy przeglądowej i dwóch prac oryginalnych.

W pracy przeglądowej (Postepy Hig. Med. Dosw., 2020, 74, 572-588), podsumowano aktualny stan wiedzy dotyczący pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki bakteryjne jako mediatorów komunikacji międzykomórkowej.

W pierwszym etapie realizacji projektu doktorskiego, opisanym w pracy oryginalnej (Int. J. Mol. Sci., 2022, 23, 5797), wyizolowano pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z trzech filotypów *C. acnes* (IA1, IB i II), które zostały poddane analizie morfologicznej, oraz porównano ich profile białkowe i lipidowe. Wykazano wyraźne różnice w profilach białkowych

5

i lipidowych badanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, co sugeruje obecność potencjalnych struktur antygenowych mogących selektywnie indukować odpowiedź immunologiczną. Jest to cenna cecha, która wskazuje na potencjał pęcherzyków jako adiuwantów lub składowych szczepionek.

Dynamiczny rozwój lipidomiki sprawił, że związki lipidowe nie są postrzegane jedynie jako składniki strukturalne błon komórkowych, ale także jako antygeny i cząstki sygnałowe. W drugim etapie realizacji projektu doktorskiego opisanym w pracy (mSphere, 2024, 10.1128/msphere.00054-24) przeprowadzono porównawczą analizę lipidomiczną ośmiu szczepów *Cutibacterium*: czterech filotypów *C. acnes*, dwóch szczepów *C. granulosum*, oraz *C. avidum* i *C. namnetense*. Otrzymane wyniki pozwoliły na wyselekcjonowanie lipidów markerowych specyficznych dla badanych szczepów. Obecność niektórych związków lipidowych, takich jak kardiolipiny oraz amidy kwasów tłuszczowych, zidentyfikowano u *Cutibacterium* spp. po raz pierwszy.

Na podstawie przeprowadzonych badań szczegółowo scharakteryzowano pęcherzyki zewnątrzkomórkowe *C. acnes*. Wykazano, że odmienność genotypowa i fenotypowa filotypów *C. acnes* ma odzwierciedlenie w odmienności białek i lipidów budujących pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Porównawcza charakterystyka lipidomu rodzaju *Cutibacterium* wraz z identyfikacją specyficznych markerów molekularnych ujawnia ich potencjał diagnostyczny istotny dla mikrobiologii klinicznej.

Abstract

The genus *Cutibacterium* comprises facultative anaerobic microorganisms that are part of the human skin microbiota. Concurrently, they are also opportunistic pathogens, and may therefore pose a risk to individuals with immunodeficiency. The most significant and most thoroughly researched species within this genus is *Cutibacterium acnes* (formerly *Propionibacterium acnes*), which has been documented to play a role in the pathogenesis of acne vulgaris. Given the rapid increase in antibiotic resistance of these microorganisms and their widespread distribution, it is imperative to implement effective prevention strategies and accurate diagnostic techniques to combat *C. acnes* infections in humans.

Extracellular vesicles are spherical nanostructures secreted by prokaryotic cells that transport a variety of substances, including proteins, nucleic acids, cellular metabolites, bacterial virulence factors, and other molecules. These vesicles serve as mediators of intercellular communication. Due to these characteristics, they can selectively stimulate the host immune system, rendering them suitable for use as vaccine components.

The objective of this study was to conduct a comprehensive analysis of the lipidome of bacteria belonging to the genus *Cutibacterium* and to identify specific lipid markers with diagnostic potential for distinguishing between individual species and phylotypes. A further objective was to conduct a detailed analysis of the extracellular vesicles secreted by *C. acnes* cells, including their morphological characterisation and a comparative analysis of protein and lipid profiles. This enabled the preparation of a research platform for the potential use of these structures in vaccines.

The dissertation is comprised of a series of three publications, each of which is thematically related to the preceding one: a review and two research articles.

The review (Postepy Hig. Med. Dosw., 2020, 74, 572-588) provides a comprehensive overview of the current state of knowledge regarding extracellular vesicles secreted by bacterial cells as mediators of intercellular communication.

In the initial phase of the doctoral project outlined in the research article (Int. J. Mol. Sci., 2022, 23, 5797), extracellular vesicles were isolated from three phylotypes of *C. acnes* (IA1, IB and II) which were subjected to morphological analysis and their protein and lipid profiles were compared. Significant differences were observed in the protein and lipid profiles

of the extracellular vesicles under investigation, suggesting the presence of antigenic structures that may elicit a selective immune response. This is a valuable feature that indicates the potential of the vesicles as adjuvants or vaccine components.

The dynamic development of lipidomics has led to a shift in the perception of lipid compounds, which are now understood to be not just structural components of cell membranes but also antigens and signalling molecules. In the second phase of the PhD project described in the article (mSphere, 2024, 10.1128/msphere.00054-24), a comparative lipidomic analysis of eight *Cutibacterium* strains was conducted: four phylotypes of *C. acnes*, two strains of *C. granulosum*, and *C. avidum* and *C. namnetense*. The results obtained enabled the identification of marker lipids specific to the strains under investigation. The identification of cardiolipins and fatty acid amides in *Cutibacterium* spp. represents a novel finding.

This doctoral project has led to a comprehensive characterisation of the extracellular vesicles of *C. acnes*. The genotypic and phenotypic distinctiveness of *C. acnes* phylotypes was reflected in the differences in the proteins and lipids that constitute extracellular vesicles. A comparative characterisation of the lipidome of the genus *Cutibacterium*, together with the identification of specific molecular markers, has revealed their diagnostic potential in clinical microbiology.

Omówienie

Kliniczne znaczenie Cutibacterium spp.

Powierzchnię skóry człowieka zasiedlają miliony bakterii, spośród których najliczniej występują Cutibacterium acnes oraz Staphylococcus epidermidis [9]. Koegzystencja tych gatunków jest niezbędna dla zachowania homeostazy złożonego ekosystemu, jakim jest mikrobiom skóry [2]. Bakterie z rodzaju Cutibacterium (dawniej Propionibacterium) są Gramdodatnimi, względnie beztlenowymi drobnoustrojami, które charakteryzuje unikalny metabolizm, posiadają bowiem zdolność syntezy kwasu propionowego na drodze katabolizmu heksoz. Należą do mikroorganizmów oportunistycznych, które mogą wywoływać zakażenia u osób z deficytami odporności. Najbardziej znanym gatunkiem należącym do tego rodzaju jest Cutibacterium acnes, któremu przypisuje się rolę w patogenezie trądziku pospolitego (acne vulgaris) [10,19]. Opisano trzy podgatunki C. acnes: C. acnes subsp. acnes [16], C. acnes subspecies defendens [39] i C. acnes subsp. elongatum [16]. W celu scharakteryzowania mieszanych populacji C. acnes opracowano schemat typowania sekwencji pojedynczego locus (Single Locus Sequence Typing, SLST), który umożliwia zróżnicowanie na dziesięć klas (A do L) [2,49]. Klasy SLST od A do E odpowiadają szczepom o filotypie IA1, natomiast klasy SLST F, G, H, K i L odpowiadają odpowiednio filotypom IA2, IC, IB, II i III [2,49]. Wykazano, że filotypy IA1 oraz IA2 dominują w skórze trądzikowej, podczas gdy pozostałe są charakterystyczne dla skóry zdrowej [48]. Prawdopodobną przyczyną jest wysoka aktywność lipaz w filotypach C. acnes IA1 oraz IA2, dla których niedrożne z powodu łojotoku ujścia mieszków włosowo-łojowych stanowią idealną niszę - o ograniczonym dostępie tlenu i jednocześnie wysokiej podaży lipidów pozyskiwanych z sebum [27]. Co istotne, dominacja filotypu IA1 wiązała się z nasileniem reakcji zapalnej, podczas gdy koegzystencja filotypów IA1, II i III nie powodowała wzrostu wytwarzania cytokin prozapalnych [20]. Wydzielane przez C. acnes metabolity stymulują odpowiedź odpornościową gospodarza i powodują uwolnienie cytokin prozapalnych, co prowadzi do nasilenia zamian zapalnych w skórze [55].

Trądzik pospolity jest najczęściej występującą chorobą skóry na świecie, która dotyka aż 85% osób w okresie dojrzewania i negatywnie wpływa na jakość życia 90% z nich [37]. Jednym ze sposobów terapii w leczeniu trądziku pospolitego jest antybiotykoterapia miejscowa i/lub doustna. Rutynowe stosowanie antybiotyków w leczeniu trądziku pospolitego doprowadziło jednak do dynamicznego wzrostu oporności na te antybiotyki, nie tylko wśród *C. acnes*, ale także innych bakterii [18]. Wobec powyższego konieczne jest znalezienie rozwiązań ograniczających stosowanie antybiotyków, przy jednoczesnym skutecznym zapobieganiu nadmiernemu namnażaniu *C. acnes*. Bakterie *C. acnes* mogą także wywoływać inne infekcje m.in. tkanek miękkich (*C. acnes* IB) [41], czy zapalenie prostaty (*C. acnes* II) [13]. Ze względu na trudności związane z hodowlą tego drobnoustroju, który charakteryzuje się niskim tempem podziałów komórkowych oraz ograniczoną tolerancją tlenu, liczba wywoływanych przez nie infekcji jest często niedoszacowana. Dzięki rozwojowi technik diagnostycznych, takich jak sekwencjonowanie następnej generacji (NGS), oraz metod spektrometrycznych wzrasta liczba prawidłowo rozpoznanych infekcji o etiologii *C. acnes*. Obecnie, gatunek ten jest najczęstszą przyczyną zakażeń protez stawu barkowego [38,51], powoduje zakażenia wsierdzia będące powikłaniami po operacjach wszczepienia urządzeń kardiologicznych [47], czy infekcji po wszczepieniu implantów piersi [17]. Ze względu na rozwój procedur medycznych opartych na implantach, prawidłowa diagnostyka i przeciwdziałanie zakażeniom o etiologii *C. acnes* stanowi aktualny problem badawczy i kliniczny.

Do rodzaju *Cutibacterium* należą także inne gatunki, m.in. *C. granulosum, C. avidum* czy *C. namnetense. C. granulosum* zasiedla tę samą niszę ekologiczną co *C. acnes*, czyli bogatą w gruczoły łojowe skórę twarzy oraz pleców. Istnieją udokumentowane przypadki poważnych infekcji o etiologii *C. granulosum*, głównie zapalenia wsierdzia [52]. *C. avidum* zasiedla odmienne obszary skóry ludzkiej niż *C. acnes* i *C. granulosum*, przede wszystkim są to wilgotne okolice pach i pachwin. Dostępne są liczne doniesienia potwierdzające patogenność tego drobnoustroju, zwłaszcza wywoływanych przez niego zapaleń wewnątrzgałkowych, zapalenia prostaty czy infekcji pooperacyjnych [28]. Stosunkowo niedawno (2016) scharakteryzowano gatunek *C. namnetense*, który pierwotnie został wyizolowany z kości piszczelowej [4]. Gatunek ten preferuje głęboko położone tkanki i podobnie jak *C. avidum* może powodować zakażenia pooperacyjne [21]. Ze względu na udokumentowany potencjał chorobotwórczy bakterii z rodzaju *Cutibacterium* niezbędne staje się poznanie budowy składników strukturalnych – lipidów i białek, metabolizmu tych bakterii oraz określenie markerów diagnostycznych dla nich specyficznych.

Rola biologiczna i potencjał terapeutyczny bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są sferycznymi nanostrukturami wydzielanymi zarówno przez komórki prokariotyczne jak i eukariotyczne. Zbudowane są z dwuwarstwy fosfolipidowej, zawierają białka, kwasy nukleinowe i różne metabolity komórkowe [59]. Bakterie Gram-ujemne uwalniają pęcherzyki poprzez uwypuklenie i pączkowanie fragmentów błony zewnętrznej, podczas gdy pęcherzyki bakterii Gram-dodatnich zostają uwolnione do środowiska zewnętrznego poprzez kanały białkowe lub na drodze przeciskania przez czasowo poluzowane warstwy peptydoglikanu [8,33,57]. Przez wiele lat sądzono, że struktury te są jedynie odpadami powstającymi na drodze metabolizmu drobnoustrojów, obecnie uważa się, że te struktury są celowo wydzielane przez komórki bakterii i odgrywają istotną rolę w ich funkcjonowaniu, pośrednicząc w komunikacji międzykomórkowej. Ze względu na niewielkie rozmiary pęcherzyki są łatwo dostępne dla komórek układu odpornościowego, a zawarte w nich wzorce molekularne związane z patogenami (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP), jak również toksyny i czynniki wirulencji, są silnymi aktywatorami układu odpornościowego [6,12,30,45,54]. Te właściwości pozwalają na wykorzystanie pecherzyków do swoistego pobudzania układu odpornościowego, co sprawia, że znalazły one zastosowanie w projektowaniu szczepionek [58]. Dzięki dynamicznemu rozwojowi technik izolacji i modyfikacji tych struktur, są cennym narzędziem umożliwiającym dostarczanie antygenów bakteryjnych [29].

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe Cutibacterium acnes

Proteom pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki *C. acnes* IA1 został po raz pierwszy opisany w roku 2017 [24]. Badania te pozwoliły na zidentyfikowanie kluczowych dla tego drobnoustroju białek odpowiedzialych za procesy biochemiczne, antybiotykooporność, antagonizm między drobnoustrojami, wirulencję czy immunogenność [24]. Następnie przeprowadzona w 2018 roku przez Jeona i współpracowników porównawcza analiza lipidomiczna *C. acnes* IA1 oraz wydzielanych przez te bakterie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wykazała, że pomimo znacznego podobieństwa jakościowego zidentyfikowanych związków lipidowych, występują także istotne

różnice, zwłaszcza dotyczące występowania niektórych klas lipidów [25]. Co ciekawe, wykazano także, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzące z *C. acnes* mogą indukować fenotyp podobny do trądziku w keratynocytach oraz w odtworzonym modelu ludzkiej skóry [11].

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe reprezentujące inne filotypy niż IA1 *C. acnes* nie były wcześniej opisane, stąd niezbędne staje się dokładne poznanie ich składu białek i lipidów, co umożliwiłoby selekcję potencjalnych antygenów lub adiuwantów. Ze względu na intensywny wzrost *C. acnes* IA1 i IA2 w przebiegu trądziku pospolitego i nasilenie reakcji zapalnej szczepionka ukierunkowana specyficznie na te filotypy mogłaby być atrakcyjnym preparatem terapeutycznym. Pozyskane z tych bakterii pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą posłużyć do specyficznego pobudzania odpowiedzi odpornościowej, a w efekcie do ograniczenia ich populacji na powierzchni skóry.

Rola i potencjał diagnostyczny lipidów bakteryjnych

Lipidy są istotnymi składnikami strukturalnymi zwiększającymi trwałość błon i zapewniającymi adaptację do warunków zewnętrznych. Pełnią także rolę surowców energetycznych oraz służą jako cząstki sygnałowe [3]. Lipidy posiadają także właściwości antygenowe dzięki zdolności stymulacji limfocytów T. Cząsteczki CD1a, CD1b, CD1c i CD1d na komórkach prezentujących antygen biorą udział w prezentacji antygenów lipidowych, w tym glikolipidów pochodzenia bakteryjnego [26,56].

Z różnorodności struktur lipidowych, które różnią się charakterem szkieletu opartym na glicerolu lub sfingozynie, liczbą kwasów tłuszczowych i grupami chemicznymi, którymi mogą być modyfikowane, wynikają ich rozmaite funkcje. Kwasy tłuszczowe wchodzące w skład lipidów różnią się także długością łańcucha i liczbą wiązań podwójnych [22]. Oprócz typowych glicerofosfolipidów, takich jak fosfatydyloglicerol i fosfatydyloetanoloamina, powszechnie występujących w błonach komórkowych wielu organizmów, bakterie posiadają lipidy specyficzne gatunkowo, które wykazują wysoki poziom zmienności strukturalnej i są szczególnie przydatne do różnicowania gatunków. Jednym z przykładów jest lipopolisacharyd (LPS) będący głównym składnikiem strukturalnym błony zewnętrznej bakterii Gramujemnych. Struktura LPS różni się znacząco u różnych gatunków, przy czym antygen O jest najbardziej zróżnicowaną częścią cząsteczki [34], dlatego struktura i skład antygenu O może być wykorzystany do rozróżniania serotypów [36]. W komórkach *Mycobacterium* opisano

kilka lipidów o specyficzności gatunkowej [5,7,44,46]. Kwasy mikolowe prątków wykazują dużą różnorodność strukturalną, z różnicami obserwowanymi w długości łańcucha (60 do 90 atomów węgla), liczbie wiazań podwójnych i obecności dodatkowych grup funkcyjnych, co umożliwia wykorzystanie ich jako markerów taksonomicznych [53]. Dlatego też obserwowana wśród bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych różnorodność lipidów może uczynić je użytecznymi biomarkerami do identyfikacji drobnoustrojów.

Lipidy stosuje się do charakteryzowania mikroorganizmów od lat 60. ubiegłego stulecia [1,42], jednak metody chromatografii gazowej stosowane pierwotnie do analizy lipidów były czasochłonne i nie nadawały się do zastosowań klinicznych. W ostatnich latach opracowano nowe metody analizy lipidów z wykorzystaniem spektrometrii mas: MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time Of Flight - jonizacja próbki poprzez desorpcję laserem z matrycy z detekcją czasu przelotu jonów) [14,31,35] oraz chromatografii cieczowej LC-MS (Liquid Chromatography) [32].

MALDI-TOF MS to narzędzie analityczne mające zastosowanie w mikrobiologii klinicznej do identyfikacji mikroorganizmów na podstawie analizy profili białkowych. Profile lipidowe bakterii uzyskane w spektrometrii MALDI-TOF można zastosować do rozpoznawania drobnoustrojów. Leung i współpracownicy wykazali, że widma masowe glikolipidów umożliwiają różnicowanie klinicznie ważnych patogenów z grupy ESKAPE¹, charakteryzujących się zwiększoną opornością na antybiotyki [35].

Termin "lipidomika" został po raz pierwszy użyty przez Hana i Grossa w roku 2003 i obejmował badanie lipidomu komórkowego próbek biologicznych, w tym komórek bakteryjnych [23]. Metody lipidomiczne zapewniają szybką identyfikację i różnicowanie drobnoustrojów oraz mogą stanowić alternatywę dla uznanych metod proteomicznych, lub je uzupełniać. Przeprowadzenie niecelowanej analizy lipidomicznej umożliwia jednoczesne zidentyfikowanie oraz określenie poziomów analitów w próbce i ma charakter całościowy, prowadzący do pozyskania metabolomicznego "odcisku palca" (ang. fingerprint).

Analiza porównawcza lipidomu (profilu lipidów komórkowych) przyczynia się do poszerzenia wiedzy o udziale cząsteczek hydrofobowych w osłonach komórkowych i metabolizmie bakterii, a także dostarcza podstaw teoretycznych do badań ich oddziaływań z komórkami ludzkimi.

¹ ESKAPE (Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp.)

Cel pracy

Celem pracy była kompleksowa analiza lipidomu bakterii należących do rodzaju *Cutibacterium* i poszukiwanie specyficznych markerów lipidowych o potencjale diagnostycznym dla rozróżniania poszczególnych gatunków i filotypów *Cutibacterium*. Zadaniem komplementarnym była szczegółowa analiza wydzielanych przez komórki *C. acnes* pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, charakterystyka morfologiczna oraz analiza porównawcza białek i lipidów, co pozwoliło na przygotowanie platformy badawczej dla potencjalnego zastosowania tych struktur w szczepionkach.

Główne zadania badawcze:

1. Wyizolowanie i określenie składu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych trzech filotypów *C. acnes*: IA1, 1B i II. Pęcherzyki były obserwowane za pomocą mikroskopii elektronowej, a następnie scharakteryzowano je z użyciem metod analitycznych, chromatograficznych i spektrometrycznych.

2. Przeprowadzenie kompleksowej analizy porównawczej kwasów tłuszczowych i lipidów komórkowych przedstawicieli rodzaju *Cutibacterium* (Tabela 1). Kwasy tłuszczowe, w postaci estrów metylowych, analizowano za pomocą chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas (GC-MS), a ekstrakty lipidowe za pomocą chromatografii cieczowej (LC-MS).

3. Porównanie lipidomów *Cutibacterium* spp. w celu znalezienia markerów charakterystycznych zarówno dla przedstawicieli rodzaju *Cutibacterium* jak i dla filotypów *C. acnes.*

Numer kolekcyjny	Nazwa	Źródło izolacji	Filotyp
DSM 1897	Cutibacterium acnes	skóra trądzikowa [16]	IA1
	subsp. acnes		
DSM 16379	Cutibacterium acnes	zanieczyszczenie hodowli beztlenowej [43]	IB
PCM 2334	Cutibacterium acnes	ropień skórny [40]	II
	subsp. defendens		
NCTC 13655	Cutibacterium acnes	prawidłowa skóra czoła [16]	III
	subsp. elongatum		
PCM 2401	Cutibacterium	skóra trądzikowa [50]	-
	granulosum		
PCM 2462	Cutibacterium	zanieczyszczenie hodowli [50]	-
	granulosum		
DSM 4901	Cutibacterium avidum	nieznane źródło [43]	-
DSM 29427	Cutibacterium namnetense	próbki pozyskane z zakażenia kości w wyniku	-
		interwencji chirurgicznej [43]	

Tabela 1. Szczepy *Cutibacterium* wykorzystane w projekcie doktorskim.

DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen - German Collection of Microorganisms, PCM - Polish Collection of Microorganisms, NCTC - National Collection of Type Cultures

Charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych Cutibacterium acnes

Publikacja 1

Badania prowadzące do realizacji powyższych założeń ujęte zostały w opublikowanym cyklu trzech powiązanych tematycznie prac. Pierwsza praca (**Postepy Hig. Med. Dosw., 2020, 74, 572-588**), będąca publikacją przeglądową, powstała na podstawie analizy piśmiennictwa dotyczącącego różnych aspektów pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki bakteryjne. W pracy scharakteryzowano prawdopodobne mechanizmy biogenezy pęcherzyków, historię ich odkrycia, nazewnictwo, metody izolacji, skład, opisano funkcje jakie pełnią te struktury zarówno w oddziaływaniach między drobnoustrojami, jak również ich interakcje z komórkami eukariotycznymi oraz zastosowania biomedyczne. Przygotowanie manuskryptu pracy przeglądowej umożliwiło zdobycie szerokiej wiedzy dotyczącej bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, poznanie metod stosowanych w badaniach nad nimi oraz przygotowanie protokołów dotyczących hodowli, izolacji czy oczyszczania, niezbędnych w kolejnych etapach realizacji projektu doktorskiego.

Publikacja 2

Druga praca cyklu (Int. J. Mol. Sci., 2022, 23, 5797), będąca publikacją oryginalną, dotyczy charakterystyki morfologicznej oraz porównania profilów białkowych i lipidowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki C. acnes reprezentowanych przez trzy filotypy: IA1, IB i II. Pęcherzyki były obserwowane przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (Transmission Electron Microscopy, TEM), a średnicę tych cząstek mierzono przy pomocy analizatora cząstek wykorzystującego dynamiczne rozpraszanie światła (Dynamic Light Scattering, DLS). Analizy te potwierdziły obecność sferycznych struktur o wartościach średnicy w zakresie 80,15 - 93,84 nm. Profile białkowe pęcherzyków zewnątrzkomórkowych C. acnes analizowano z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących w obecności SDS (SDS-PAGE), w porównaniu do frakcji uzyskanych z komórek C. acnes: białek powierzchniowych, cytozolu oraz białek ściany komórkowej i lizatów komórkowych. Pozwoliło to nie tylko na porównanie składu białkowego pęcherzyków otrzymanych z różnych filotypów C. acnes między sobą, ale także na przybliżone określenie ich "komórkowej lokalizacji". Porównanie poszczególnych frakcji białkowych pęcherzyków wykazało znaczące różnice, zwłaszcza w wielkości i liczbie białek. Warto podkreślić, że wyniki te zostały potwierdzone przez Cros i współpracowników, którzy wyizolowali pęcherzyki zewnątrzkomórkowe o podobnej średnicy w 2023 roku i również zaobserwowali różnice w profilach białkowych pęcherzyków z filotypów IA1 i IB w analizie SDS-PAGE [15]. W kolejnym etapie uzyskano ekstrakty lipidowe zarówno z pecherzyków zewnątrzkomórkowych jak i komórek trzech filotypów C. acnes. Ekstrakty te analizowano z wykorzystaniem dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (2D-TLC) oraz spektrometrii mas MALDI-TOF. Na podstawie analizy 2D-TLC zaobserwowano wyraźne różnice w profilach lipidowych zarówno między ekstraktami pozyskanymi z pęcherzyków jak i między ekstraktami pozyskanymi z liofilizatów komórkowych. Zarówno ekstrakty lipidowe pozyskane z pęcherzyków jak i komórkowe ekstrakty lipidowe różnią się od siebie w zależności od filotypu. Ekstrakty komórkowe były bogatsze w lipidy niż ekstrakty z pęcherzyków, co wskazuje, że skład pęcherzyków jest regulowany przez komórki bakteryjne. Profile lipidowe analizowano także z wykorzystaniem spektrometrii mas MALDI-TOF. Porównanie pozyskanych tą metodą widm masowych oraz wygenerowanych na ich podstawie wartości m/z, pozwoliło na wyselekcjonownowanie zarówno lipidów wspólnych jak i specyficznych dla poszczególnych ekstraktów pęcherzykowych. Wyniki te jednoznacznie potwierdziły, że ekstrakty pęcherzykowe różnią się w zależności od filotypu, z którego są izolowane oraz, że bogatsze w lipidy komórki bakteryjne selektywnie "upakowują" ich zawartość. Profilowanie lipidów za pomocą MALDI-TOF MS może stanowić precyzyjną metodę uzupełniającą do uznanych technik opartych na analizie białek i umożliwia różnicowanie na poziomie filotypów.

Kompleksowa analiza lipidomiczna Cutibacterium spp

Publikacja 3

Trzecia przedstawiona praca, będąca publikacją oryginalną (mSphere, 2024, 10.1128/msphere.00054-24), dotyczy porównawczej analizy lipidomicznej ośmiu szczepów Cutibacterium: czterech filotypów C. acnes: IA1, IB, II i III, dwóch szczepów C. granulosum, oraz C. avidum i C. namnetense (Tabela 1). Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły, że profilowanie lipidów za pomocą LC-MS może być stosowane do rozróżniania poszczególnych gatunków i filotypów. Analiza głównych składowych dodatkowo określa, które z opisanych analitów lipidowych mają szczególny wpływ na grupowanie szczepów. Zastosowane podejście jest szczególnie istotne, gdyż poszukiwanie związków charakterystycznych dla drobnoustrojów oportunistycznych i patogenów wpisuje się w nowe trendy diagnostyczne oparte na spektrometrii mas. W pracy tej analizowano zarówno skład jakościowy i ilościowy kwasów tłuszczowych Cutibacterium z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometria mas (GC-MS) oraz pełny lipidom komórek bakteryjnych, stosując chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (LC-MS) w dodatnim i ujemnym trybie jonów. Podejście to umożliwiło wykrycie możliwie największej liczby związków lipidowych. W rezultacie zidentyfikowano 90 lipidów w trybie dodatnim i 38 w trybie ujemnym, spośród których możliwe było wyselekcjonowanie związków markerowych, w tym charakterystycznych nawet dla poszczególnych filotypów C. acnes. Należą do nich fosfatydylocholina PC 30:0, występująca w znacznych ilościach jedynie w komórkach C. acnes IB, sfingomieliny (SM 33:1 zidentyfikowana w komórkach C. acnes II i C. namnetense; SM 35:1 obecna w komórkach C. acnes II i III) oraz fosfatydyloglicerol z podstawnikiem alkiloeterowym PG O-32:0, charakterystyczny dla komórek C. acnes IB. Ponadto, po raz pierwszy stwierdzono obecność lipidów należących do klasy amidów kwasów tłuszczowych -N-acyloetanoloamin (NAE), w których grupa acylowa jest połączona z atomem azotu etanoloaminy, oraz obecność fosfolipidów należących do podklasy kardiolipin u tych bakterii. Wykazano, że badania lipidomiczne pozwalają na uzyskanie precyzyjnego "odcisku palca" dla *Cutibacterium* spp. oraz na selekcję nowych markerów lipidowych o potencjale diagnostycznym.

Podsumowanie

Podsumowując, założony cel pracy doktorskiej został osiągnięty. W toku badań uzyskano oczyszczone pęcherzyki zewnątrzkomórkowe trzech filotypów *C. acnes*, scharakteryzowano je pod względem morfologii oraz porównano ich profile białkowe i lipidowe. Wykazano różnice w wielkości i liczbie białek oraz w liczbie lipidów w zależności od filotypu *C. acnes*, co pozwala wnioskować, że skład bakteryjnych pęcherzyków oraz obecne tam potencjalne antygeny są charakterystyczne dla poszczególnych filotypów, w tym uważanych za patogenne i mogą selektywnie indukować odpowiedź odpornościową. Te cechy powodują, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe *C. acnes* mogłyby być stosowane jako składowe szczepionek lub ich adiuwanty.

Porównawcza analiza lipidomiczna bakterii z rodzaju *Cutibacterium* z wykorzystaniem LC-MS wykazała, że profilowanie lipidomiczne jest skutecznym narzędziem do różnicowania bakterii, nawet na poziomie filotypów należących do tego samego gatunku. Obserwowane wyraźne różnice w składzie lipidowym *Cutibacterium* umożliwiają selekcję związków lipidowych do dalszych badań. Wyniki uzyskane poprzez kompleksową analizę lipidomiczną bakterii z rodzaju *Cutibacterium* mogą posłużyć w projektowaniu nowych narzędzi diagnostycznych dla mikrobiologii klinicznej.

Piśmiennictwo

- Abel, K., Deschmertzing, H., Peterson, J.I. (1963) Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. I. Feasibility of utilizing gas chromatography. J. Bacteriol 85(5), 1039–44, Doi: 10.1128/jb.85.5.1039-1044.1963.
- [2] Ahle, C.M., Stødkilde, K., Poehlein, A., Bömeke, M., Streit, W.R., Wenck, H., Reuter, J.H., Hüpeden, J., Brüggemann, H. (2022) Interference and co-existence of staphylococci and Cutibacterium acnes within the healthy human skin microbiome. Commun Biol 5(1), 923, Doi: 10.1038/s42003-022-03897-6.
- [3] Appala, K., Bimpeh, K., Freeman, C., Hines, K.M. (2020) Recent applications of mass spectrometry in bacterial lipidomics. Anal. Bioanal. Chem. 412(24), 5935–43, Doi: 10.1007/s00216-020-02541-8.
- [4] Aubin, G.G., Bémer, P., Kambarev, S., Patel, N.B., Lemenand, O., Caillon, J., Lawson, P.A., Corvec, S. (2016) Propionibacterium namnetense sp. nov., isolated from a human bone infection. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66(9), 3393–9, Doi: 10.1099/ijsem.0.001204.
- [5] Batt, S.M., Minnikin, D.E., Besra, G.S. (2020) The thick waxy coat of mycobacteria, a protective layer against antibiotics and the host's immune system. Biochemical Journal 477(10), 1983–2006, Doi: 10.1042/BCJ20200194.
- [6] Bottero, D., Gaillard, M.E., Zurita, E., Moreno, G., Martinez, D.S., Bartel, E., Bravo, S., Carriquiriborde, F., Errea, A., Castuma, C., Rumbo, M., Hozbor, D. (2016) Characterization of the immune response induced by pertussis OMVs-based vaccine. Vaccine 34(28), 3303–9, Doi: 10.1016/j.vaccine.2016.04.079.
- [7] Brennan, P.J., Nikaido, H. (1995) The Envelope of Mycobacteria. Annu. Rev. Biochem. 64, 29–63, Doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000333.
- [8] Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., Casadevall, A. (2015) Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. Nat. Rev. Microbiol. 13(10), 620–30, Doi: 10.1038/nrmicro3480.
- [9] Byrd, A.L., Belkaid, Y., Segre, J.A. (2018) The human skin microbiome. Nat Rev Microbiol 16(3), 143–55, Doi: 10.1038/nrmicro.2017.157.
- [10] Cavallo, I., Sivori, F., Truglio, M., De Maio, F., Lucantoni, F., Cardinali, G., Pontone, M., Bernardi, T., Sanguinetti, M., Capitanio, B., Cristaudo, A., Ascenzioni, F., Morrone, A., Pimpinelli, F., Di Domenico, E.G. (2022) Skin dysbiosis and Cutibacterium acnes biofilm in inflammatory acne lesions of adolescents. Sci Rep 12(1), 21104, Doi: 10.1038/s41598-022-25436-3.
- [11] Choi, E.-J., Lee, H.G., Bae, I.-H., Kim, W., Park, J., Lee, T.R., Cho, E.-G. (2018) Propionibacterium acnes-derived extracellular vesicles promote acne-like phenotypes in human epidermis. Journal of Investigative Dermatology 138(6), 1371–9, Doi: 10.1016/j.jid.2018.01.007.
- [12] Chudzik, A., Paściak, M. (2020) Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako mediatory komunikacji międzykomórkowej. Postepy Hig Med Dosw 74, 572–88.
- [13] Cohen, R.J., Shannon, B.A., McNEAL, J.E., Shannon, T., Garrett, K.L. (2005) Propionibacterium acnes associated with inflammation in radical prostatectomy specimens: a possible link to cancer evolution. Journal of Urology 173(6), 1969–74, Doi: 10.1097/01.ju.0000158161.15277.78.
- [14] Cox, C.R., Jensen, K.R., Saichek, N.R., Voorhees, K.J. (2015) Strain-level bacterial identification by CeO2-catalyzed MALDI-TOF MS fatty acid analysis and comparison to commercial protein-based methods. Sci Rep 5(1), 10470, Doi: 10.1038/srep10470.

- [15] Cros, M.P., Mir-Pedrol, J., Toloza, L., Knödlseder, N., Maruotti, J., Zouboulis, C.C., Güell, M., Fábrega, M.-J. (2023) New insights into the role of Cutibacterium acnesderived extracellular vesicles in inflammatory skin disorders. Sci Rep 13(1), 16058, Doi: 10.1038/s41598-023-43354-w.
- [16] Dekio, I., McDowell, A., Sakamoto, M., Tomida, S., Ohkuma, M. (2019) Proposal of new combination, Cutibacterium acnes subsp. elongatum comb. nov., and emended descriptions of the genus Cutibacterium, Cutibacterium acnes subsp. acnes and Cutibacterium acnes subsp. defendens. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 69(4), 1087–92, Doi: 10.1099/ijsem.0.003274.
- [17] Del Pozo, J.L., Tran, N.V., Petty, P.M., Johnson, C.H., Walsh, M.F., Bite, U., Clay, R.P., Mandrekar, J.N., Piper, K.E., Steckelberg, J.M., Patel, R. (2009) Pilot Study of Association of Bacteria on Breast Implants with Capsular Contracture. J Clin Microbiol 47(5), 1333–7, Doi: 10.1128/JCM.00096-09.
- [18] Dessinioti, C., Katsambas, A. (2022) Antibiotics and Antimicrobial Resistance in Acne: Epidemiological Trends and Clinical Practice Considerations. Yale Journal of Biology and Medicine 95, 429–43.
- [19] Dessinioti, C., Katsambas, A.D. (2010) The role of Propionibacterium acnes in acne pathogenesis: facts and controversies. Clin. Dermatol. 28(1), 2–7, Doi: 10.1016/j.clindermatol.2009.03.012.
- [20] Dreno, B., Dekio, I., Baldwin, H., Demessant, A.L., Dagnelie, M., Khammari, A., Corvec, S. (2024) Acne microbiome: From phyla to phylotypes. Acad Dermatol Venereol 38(4), 657–64, Doi: 10.1111/jdv.19540.
- [21] Erbežnik, A., Celar Šturm, A., Strašek Smrdel, K., Triglav, T., Maver Vodičar, P. (2023) Comparative Genomic Analysis of Cutibacterium spp. Isolates in Implant-Associated Infections. Microorganisms 11(12), 2971, Doi: 10.3390/microorganisms11122971.
- [22] Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M.S., White, S.H., Witztum, J.L., Dennis, E.A. (2005) A comprehensive classification system for lipids. Journal of Lipid Research 46(5), 839–61, Doi: 10.1194/jlr.E400004-JLR200.
- [23] Han, X., Gross, R.W. (2003) Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. Journal of Lipid Research 44(6), 1071–9, Doi: 10.1194/jlr.R300004-JLR200.
- [24] Jeon, J., Mok, H.J., Choi, Y., Park, S.C., Jo, H., Her, J., Han, J.-K., Kim, Y.-K., Kim, K.P., Ban, C. (2017) Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from *Propionibacterium acnes*. Prot. Clin. Appl. 11(1–2), 1600040, Doi: 10.1002/prca.201600040.
- [25] Jeon, J., Park, S.C., Her, J., Lee, J.W., Han, J.-K., Kim, Y.-K., Kim, K.P., Ban, C. (2018) Comparative lipidomic profiling of the human commensal bacterium *Propionibacterium* acnes and its extracellular vesicles. RSC Adv. 8(27), 15241–7, Doi: 10.1039/C7RA13769A.
- [26] Kaczmarek, R., Pasciak, M., Szymczak-Kulus, K., Czerwinski, M. (2017) CD1: A Singed Cat of the Three Antigen Presentation Systems. Arch. Immunol. Ther. Exp. 65(3), 201–14, Doi: 10.1007/s00005-017-0461-y.
- [27] Kim, H.J., Lee, B.-J., Kwon, A.-R. (2020) The grease trap: uncovering the mechanism of the hydrophobic lid in Cutibacterium acnes lipase. Journal of Lipid Research 61(5), 722– 33, Doi: 10.1194/jlr.RA119000279.
- [28] Koizumi, J., Nakase, K., Hayashi, N., Nasu, Y., Hirai, Y., Nakaminami, H. (2022) Multidrug-resistant Cutibacterium avidum isolated from patients with acne vulgaris and

other infections. Journal of Global Antimicrobial Resistance 28, 151–7, Doi: 10.1016/j.jgar.2021.12.021.

- [29] Krishnan, N., Kubiatowicz, L.J., Holay, M., Zhou, J., Fang, R.H., Zhang, L. (2022) Bacterial membrane vesicles for vaccine applications. Advanced Drug Delivery Reviews 185, 114294, Doi: 10.1016/j.addr.2022.114294.
- [30] Lapinet, J.A., Scapini, P., Calzetti, F., Pérez, O., Cassatella, M.A. (2000) Gene expression and production of Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin-1(IL-1), IL-8, Macrophage Inflammatory Protein 1 (MIP-1) and Gamma Interferon-Inducible Protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. Infect. Immun. 68, 6917–23.
- [31] Larrouy-Maumus, G., Puzo, G. (2015) Mycobacterial envelope lipids fingerprint from direct MALDI-TOF MS analysis of intact bacilli. Tuberculosis 95(1), 75–85, Doi: 10.1016/j.tube.2014.11.001.
- [32] Layre, E., Al-Mubarak, R., Belisle, J.T., Branch Moody, D. (2014) Mycobacterial Lipidomics. Microbiol. Spectr. 2(3), 2.3.03, Doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0033-2013.
- [33] Lee, E.-Y., Choi, D.-Y., Kim, D.-K., Kim, J.-W., Park, J.O., Kim, S., Kim, S.-H., Desiderio, D.M., Kim, Y.-K., Kim, K.-P., Gho, Y.S. (2009) Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles. Proteomics 9(24), 5425–36, Doi: 10.1002/pmic.200900338.
- [34] Lerouge, I., Vanderleyden, J. (2001) O-antigen structural variation : mechanisms and possible roles in animal/plant microbe interactions. FEMS Microbiol Rev 26(17), 47, Doi: https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00597.x.
- [35] Leung, L.M., Fondrie, W.E., Doi, Y., Johnson, J.K., Strickland, D.K., Ernst, R.K., Goodlett, D.R. (2017) Identification of the ESKAPE pathogens by mass spectrometric analysis of microbial membrane glycolipids. Sci Rep 7(1), 6403, Doi: 10.1038/s41598-017-04793-4.
- [36] Liu, B., Knirel, Y.A., Feng, L., Perepelov, A.V., Senchenkova, S.N., Reeves, P.R., Wang, L. (2014) Structural diversity in *Salmonella* O antigens and its genetic basis. FEMS Microbiol Rev 38(1), 56–89, Doi: 10.1111/1574-6976.12034.
- [37] Lukaviciute, L., Navickas, P., Navickas, A., Grigaitiene, J., Ganceviciene, R., Zouboulis, C.C. (2017) Quality of life, anxiety prevalence, depression symptomatology and suicidal ideation among acne patients in Lithuania. Acad Dermatol Venereol 31(11), 1900–6, Doi: 10.1111/jdv.14477.
- [38] Mayslich, C., Grange, P.A., Dupin, N. (2021) Cutibacterium acnes as an Opportunistic Pathogen: An Update of Its Virulence-Associated Factors. Microorganisms 9(2), 303, Doi: 10.3390/microorganisms9020303.
- [39] McDowell, A., Barnard, E., Liu, J., Li, H., Patrick, S. (2016) Proposal to reclassify Propionibacterium acnes type I as Propionibacterium acnes subsp. acnes subsp. nov. and Propionibacterium acnes type II as Propionibacterium acnes subsp. defendens subsp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 66(12), 5358– 65, Doi: 10.1099/ijsem.0.001521.
- [40] McDowell, A., Barnard, E., Liu, J., Li, H., Patrick, S. (2016) Proposal to reclassify Propionibacterium acnes type I as Propionibacterium acnes subsp. acnes subsp. nov. and Propionibacterium acnes type II as Propionibacterium acnes subsp. defendens subsp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66(12), 5358–65, Doi: 10.1099/ijsem.0.001521.
- [41] McDowell, A., Nagy, I., Magyari, M., Barnard, E., Patrick, S. (2013) The Opportunistic Pathogen Propionibacterium acnes: Insights into Typing, Human Disease, Clonal

Diversification and CAMP Factor Evolution. PLoS ONE 8(9), e70897, Doi: 10.1371/journal.pone.0070897.

- [42] Moss, C.W., Lewis, V.J. (1967) Characterization of Clostridia by Gas Chromatography. Appl Microbiol. 15(2), 390–7, Doi: 10.1128/am.15.2.390-397.1967.
- [43] Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J.P., Woyke, T., Kyrpides, N.C., Pukall, R., Klenk, H.-P., Goodfellow, M., Göker, M. (2018) Genome-Based Taxonomic Classification of the Phylum Actinobacteria. Front. Microbiol. 9, 2007, Doi: 10.3389/fmicb.2018.02007.
- [44] Ortalo-Magné, A., Lemassu, A., Lanéelle, M.A., Bardou, F., Silve, G., Gounon, P., Marchal, G., Daffé, M. (1996) Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacterial species. J Bacteriol 178(2), 456–61, Doi: 10.1128/jb.178.2.456-461.1996.
- [45] Pritsch, M., Ben-Khaled, N., Chaloupka, M., Kobold, S., Berens-Riha, N., Peter, A., Liegl, G., Schubert, S., Hoelscher, M., Löscher, T., Wieser, A. (2016) Comparison of intranasal outer membrane vesicles with Cholera toxin and injected MF59C.1 as adjuvants for malaria transmission blocking antigens AnAPN1 and Pfs48/45. Journal of Immunology Research 2016, 3576028, Doi: 10.1155/2016/3576028.
- [46] Ripoll, F., Deshayes, C., Pasek, S., Laval, F., Beretti, J.-L., Biet, F., Risler, J.-L., Daffé, M., Etienne, G., Gaillard, J.-L., Reyrat, J.-M. (2007) Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in Mycobacterium abscessus and M. chelonae. BMC Genomics 8(1), 114, Doi: 10.1186/1471-2164-8-114.
- [47] Rohacek, M., Weisser, M., Kobza, R., Schoenenberger, A.W., Pfyffer, G.E., Frei, R., Erne, P., Trampuz, A. (2010) Bacterial Colonization and Infection of Electrophysiological Cardiac Devices Detected With Sonication and Swab Culture. Circulation 121(15), 1691–7, Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.906461.
- [48] Rozas, M., Hart de Ruijter, A., Fabrega, M.J., Zorgani, A., Guell, M., Paetzold, B., Brillet, F. (2021) From Dysbiosis to Healthy Skin: Major Contributions of Cutibacterium acnes to Skin Homeostasis. Microorganisms 9(3), 628, Doi: 10.3390/microorganisms9030628.
- [49] Scholz, C.F.P., Jensen, A., Lomholt, H.B., Brüggemann, H., Kilian, M. (2014) A Novel High-Resolution Single Locus Sequence Typing Scheme for Mixed Populations of Propionibacterium acnes In Vivo. PLoS ONE 9(8), e104199, Doi: 10.1371/journal.pone.0104199.
- [50] Scholz, C.F.P., Kilian, M. (2016) The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus Propionibacterium to the proposed novel genera Acidipropionibacterium gen. nov., Cutibacterium gen. nov. and Pseudopropionibacterium gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66(11), 4422–32, Doi: 10.1099/ijsem.0.001367.
- [51] Singh, J.A., Sperling, J.W., Schleck, C., Harmsen, W., Cofield, R.H. (2012) Periprosthetic infections after shoulder hemiarthroplasty. Journal of Shoulder and Elbow Surgery 21(10), 1304–9, Doi: 10.1016/j.jse.2011.08.067.
- [52] Sohail, M.R., Gray, A.L., Baddour, L.M., Tleyjeh, I.M., Virk, A. (2009) Infective endocarditis due to Propionibacterium species. Clin Microbiol Inf 15(4), 387–94, Doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02703.x.
- [53] Song, S.H., Park, K.U., Lee, J.H., Kim, E.C., Kim, J.Q., Song, J. (2009) Electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the mycolic acid profiles for the identification of common clinical isolates of mycobacterial species. Journal of Microbiological Methods 77(2), 165–77, Doi: 10.1016/j.mimet.2009.01.023.

- [54] Tan, K., Li, R., Huang, X., Liu, Q. (2018) Outer Membrane Vesicles: Current Status and Future Direction of These Novel Vaccine Adjuvants. Front. Microbiol. 9, 783, Doi: 10.3389/fmicb.2018.00783.
- [55] Tanghetti, E.A. (2013) The Role of Inflammation in the Pathology of Acne 6(9). J Clin Aesthet Dermatol 6(9), 27-35.
- [56] Ulrichs, T., Moody, D.B., Grant, E., Kaufmann, S.H.E., Porcelli, S.A. (2003) T-Cell Responses to CD1-Presented Lipid Antigens in Humans with Mycobacterium tuberculosis Infection. Infect. Immun. 71(6), 3076–87, Doi: 10.1128/IAI.71.6.3076-3087.2003.
- [57] Vallejo, M.C., Nakayasu, E.S., Longo, L.V.G., Ganiko, L., Lopes, F.G., Matsuo, A.L., Almeida, I.C., Puccia, R. (2012) Correction: Lipidomic analysis of extracellular vesicles from the pathogenic phase of Paracoccidioides brasiliensis. PLoS ONE 7(10), e39463, Doi: 10.1371/annotation/08ed7ef4-7f80-4aed-9929-98d39c3ca83f.
- [58] Wang, S., Gao, J., Wang, Z. (2019) Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. WIREs Nanomed. Nanobiotechnol. 11(2), e1523, Doi: 10.1002/wnan.1523.
- [59] Xie, J., Haesebrouck, F., Van Hoecke, L., Vandenbroucke, R.E. (2023) Bacterial extracellular vesicles: an emerging avenue to tackle diseases. Trends in Microbiology 31(12), 1206–24, Doi: 10.1016/j.tim.2023.05.010.

Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy

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

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

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

Oświadczenia współautorów

14.05.2024 r.

Anna Chudzik Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk ul. Rudolfa Weigla 12 53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Chudzik A., Paściak M., *Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako mediatory komunikacji międzykomórkowej*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2020, 74, 572-588

Autor	Opis udziału własnego
Anna Chudzik	Przegląd literatury, wykonanie rycin, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, odpowiedź na recenzje
Mariola Paściak	Nadzór nad przygotowaniem manuskryptu, korekta merytoryczna, odpowiedź na recenzje, autor korespondencyjny

Judah

(Podpis współautora)

14.05.2024 r.

Mariola Paściak Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk ul. Rudolfa Weigla 12 53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Chudzik A., Paściak M., Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako mediatory komunikacji międzykomórkowej, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2020, 74, 572-588

Autor	Opis udziału własnego
Anna Chudzik	Przegląd literatury, wykonanie rycin, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, odpowiedź na recenzje
Mariola Paściak	Nadzór nad przygotowaniem manuskryptu, korekta merytoryczna, odpowiedź na recenzje, autor korespondencyjny

(Podpis współautora) Monie Pascueli

Wrocław 25.04.2024 r.

Anna Chudzik Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk ul. Rudolfa Weigla 12 53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Chudzik A., Migdał P., Paściak M., *Different Cutibacterium acnes Phylotypes Release Distinct Extracellular Vesicles*, International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(10), 5797, 10.3390/ijms23105797

Autor	Opis udziału własnego
Anna Chudzik	Opracowanie koncepcji badań, prowadzenie hodowli bakteryjnych (optymalizacja warunków), izolacja i oczyszczanie bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, analiza DLS, izolacja i analiza frakcji białkowych uzyskanych z komórek <i>C. acnes</i> (oznaczenie stężeń, elektroforeza SDS-PAGE), ekstrakcja lipidów z pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz z komórek <i>C. acnes</i> , wykonanie 2D TLC, analiza MALDI-TOF MS, opracowanie wyników, przygotowanie rycin, przegląd literatury, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, odpowiedzi na recenzje
Paweł Migdał	Przygotowanie próbek i obrazowanie TEM
Mariola Paściak	Opracowanie koncepcji badań, nadzór merytoryczny nad przeprowadzanymi eksperymentami, nadzór nad analizą i wizualizacją danych, korekta i edycja manuskryptu, odpowiedzi na recenzje, autor korespondencyjny

leudrik

(Podpis współautora)

Wrocław 25.04.2024 r.

Paweł Migdał Międzyzakładowa Pracownia Analizy Instrumentalnej i Preparatyki Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk ul. Rudolfa Weigla 12 53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Chudzik A., Migdał P., Paściak M., *Different Cutibacterium acnes Phylotypes Release Distinct Extracellular Vesicles*, International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(10), 5797, 10.3390/ijms23105797

Autor	Opis udziału własnego
Anna Chudzik	Opracowanie koncepcji badań, prowadzenie hodowli bakteryjnych (optymalizacja warunków), izolacja i oczyszczanie bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, analiza DLS, izolacja i analiza frakcji białkowych uzyskanych z komórek <i>C. acnes</i> (oznaczenie stężeń, elektroforeza SDS-PAGE), ekstrakcja lipidów z pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz z komórek <i>C. acnes</i> , wykonanie 2D TLC, analiza MALDI-TOF MS, opracowanie wyników, przygotowanie rycin, przegląd literatury, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, odpowiedzi na recenzje
Paweł Migdał	Przygotowanie próbek i obrazowanie TEM
Mariola Paściak	Opracowanie koncepcji badań, nadzór merytoryczny nad przeprowadzanymi eksperymentami, nadzór nad analizą i wizualizacją danych, korekta i edycja manuskryptu, odpowiedzi na recenzje, autor korespondencyjny

(Podpis współautora)

Mariola Paściak Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk ul. Rudolfa Weigla 12 53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Chudzik A., Migdał P., Paściak M., *Different Cutibacterium acnes Phylotypes Release Distinct Extracellular Vesicles*, International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(10), 5797, 10.3390/ijms23105797

Autor	Opis udziału własnego
Anna Chudzik	Opracowanie koncepcji badań, prowadzenie hodowli bakteryjnych (optymalizacja warunków), izolacja i oczyszczanie bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, analiza DLS, izolacja i analiza frakcji białkowych uzyskanych z komórek <i>C. acnes</i> (oznaczenie stężeń, elektroforeza SDS-PAGE), ekstrakcja lipidów z pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz z komórek <i>C. acnes</i> , wykonanie 2D TLC, analiza MALDI-TOF MS, opracowanie wyników, przygotowanie rycin, przegląd literatury, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, odpowiedzi na recenzje
Paweł Migdał	Przygotowanie próbek i obrazowanie TEM
Mariola Paściak	Opracowanie koncepcji badań, nadzór merytoryczny nad przeprowadzanymi eksperymentami, nadzór nad analizą i wizualizacją danych, korekta i edycja manuskryptu, odpowiedzi na recenzje, autor korespondencyjny

Monide Pesul

(Podpis współautora)

14.05.2024 r.

Anna Chudzik Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk ul. Rudolfa Weigla 12 53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Chudzik A., Bromke M.A., Gamian A., Paściak M. *Comprehensive lipidomic analysis of the genus Cutibacterium*, mSphere. 2024 May 7:e0005424. doi: 10.1128/msphere.00054-24 jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Opis udziału własnego
Anna Chudzik	Planowanie badań, prowadzenie hodowli bakteryjnych szczepów <i>Cutibacterium</i> (optymalizacja warunków), wyznaczenie krzywych wzrostu, uzyskanie ekstraktów lipidowych z komórek bakterii, analiza kwasów tłuszczowych za pomocą GC-MS, analiza danych LC-MS, opracowanie wyników, modyfikacja rycin, przegląd literatury, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, odpowiedź na recenzje, korekta manuskryptu
Mariusz A. Bromke	Analiza LC-MS ekstraktów lipidowych, analiza danych wyjściowych, statystyczne opracowanie wyników, zarządzanie danymi, przygotowanie rycin, uzupełnienie i korekta manuskryptu
Andrzej Gamian	Korekta manuskryptu, finansowanie
Mariola Paściak	Przygotowanie koncepcji prowadzonych badań, nadzór merytoryczny nad wykonywaniem eksperymentów, nadzór nad analizą i wizualizacją danych, korekta manuskryptu, odpowiedź na recenzje, autor korespondencyjny

auchit

(Podpis współautora)

14.05.2024 r.

Mariusz A. Bromke Katedra Biochemii i Immunochemii Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wyb. Ludwika Pasteura 1, 50-367 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Chudzik A., Bromke M.A., Gamian A., Paściak M. Comprehensive lipidomic analysis of the genus Cutibacterium, mSphere. 2024 May 7:e0005424. doi: 10.1128/msphere.00054-24 jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Opis udziału własnego
Anna Chudzik	Planowanie badań, prowadzenie hodowli bakteryjnych szczepów <i>Cutibacterium</i> (optymalizacja warunków), wyznaczenie krzywych wzrostu, uzyskanie ekstraktów lipidowych z komórek bakterii, analiza kwasów tłuszczowych za pomocą GC-MS, analiza danych LC-MS, opracowanie wyników, modyfikacja rycin, przegląd literatury, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, odpowiedź na recenzje, korekta manuskryptu
Mariusz A. Bromke	Analiza LC-MS ekstraktów lipidowych, analiza danych wyjściowych, statystyczne opracowanie wyników, zarządzanie danymi, przygotowanie rycin, uzupełnienie i korekta manuskryptu
Andrzej Gamian	Korekta manuskryptu, finansowanie
Mariola Paściak	Przygotowanie koncepcji prowadzonych badań, nadzór merytoryczny nad wykonywaniem eksperymentów, nadzór nad analizą i wizualizacją danych, korekta manuskryptu, odpowiedź na recenzje, autor korespondencyjny

(Podpis prspolautora)

Andrzej Gamian Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk ul. Rudolfa Weigla 12 53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Chudzik A., Bromke M.A., Gamian A., Paściak M. Comprehensive lipidomic analysis of the genus Cutibacterium, mSphere. 2024 May 7:e0005424. doi: 10.1128/msphere.00054-24 jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Opis udziału własnego
Anna Chudzik	Planowanie badań, prowadzenie hodowli bakteryjnych szczepów <i>Cutibacterium</i> (optymalizacja warunków), wyznaczenie krzywych wzrostu, uzyskanie ekstraktów lipidowych z komórek bakterii, analiza kwasów tłuszczowych za pomocą GC-MS, analiza danych LC-MS, opracowanie wyników, modyfikacja rycin, przegląd literatury, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, odpowiedź na recenzje, korekta manuskryptu
Mariusz A. Bromke	Analiza LC-MS ekstraktów lipidowych, analiza danych wyjściowych, statystyczne opracowanie wyników, zarządzanie danymi, przygotowanie rycin, uzupełnienie i korekta manuskryptu
Andrzej Gamian	Korekta manuskryptu, finansowanie
Mariola Paściak	Przygotowanie koncepcji prowadzonych badań, nadzór merytoryczny nad wykonywaniem eksperymentów, nadzór nad analizą i wizualizacją danych, korekta manuskryptu, odpowiedź na recenzje, autor korespondencyjny

1

(Podpis współautora)

14.05.2024 r.

Mariola Pesciel

(Podpis współautora)

Mariola Paściak Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk ul. Rudolfa Weigla 12 53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Chudzik A., Bromke M.A., Gamian A., Paściak M. *Comprehensive lipidomic analysis of the genus Cutibacterium*, mSphere. 2024 May 7:e0005424. doi: 10.1128/msphere.00054-24 jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Opis udziału własnego
Anna Chudzik	Planowanie badań, prowadzenie hodowli bakteryjnych szczepów <i>Cutibacterium</i> (optymalizacja warunków), wyznaczenie krzywych wzrostu, uzyskanie ekstraktów lipidowych z komórek bakterii, analiza kwasów tłuszczowych za pomocą GC-MS, analiza danych LC-MS, opracowanie wyników, modyfikacja rycin, przegląd literatury, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, odpowiedź na recenzje, korekta manuskryptu
Mariusz A. Bromke	Analiza LC-MS ekstraktów lipidowych, analiza danych wyjściowych, statystyczne opracowanie wyników, zarządzanie danymi, przygotowanie rycin, uzupełnienie i korekta manuskryptu
Andrzej Gamian	Korekta manuskryptu, finansowanie
Mariola Paściak	Przygotowanie koncepcji prowadzonych badań, nadzór merytoryczny nad wykonywaniem eksperymentów, nadzór nad analizą i wizualizacją danych, korekta manuskryptu, odpowiedź na recenzje, autor korespondencyjny

Publikacje wchodzące w skład rozprawy

Received: 03.08.2020 Accepted: 23.10.2020 Published: 28.12.2020	Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako mediatory komunikacji międzykomórkowej
	Bacterial extracellular vesicles as cell-cell communication
	mediators
	Anna Chudzik, Mariola Paściak
	Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, Wrocław
	Pamięci Prof. Haliny Mordarskiej, znakomitego mikrobiologa i wybitnego eksperta w zakresie biologii, klasyfikacji i diagnostyki mikrobiologicznej promieniowców
Streszczenie:	Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe tworzą heterogenną grupę nanocząstek, uwalnianych zarówno przez komórki prokariotyczne, jak i eukariotyczne, które pełnią zróżnicowane funk- cje biologiczne i uczestniczą w komunikacji międzykomórkowej. Bakteryjne pęcherzyki ze- wnątrzkomórkowe zbudowane są z: lipidów, białek i kwasów nukleinowych. Istnieje wiele hi- potez powstawania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, jednak ich mechanizmy biogenezy pozostają nadal niewyjaśnione. Wewnątrz pęcherzyków mogą być zawarte trudno rozpusz- czalne metabolity lub cząsteczki sygnałowe, DNA oraz RNA. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pełnią funkcje ochronne, mogą eliminować inne komórki bakteryjne, biorą również udział w horyzontalnym transferze genów. Enzymy zawarte w pęcherzykach ułatwiają drobnoustro- jom pozyskiwanie substancji odżywczych i zasiedlanie różnych nizz ekologicznych. Cząsteczki sygnałowe przenoszone w pęcherzykach umożliwiają tworzenie biofilmu. Drobnoustroje patogenne w wydzielanych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych przenoszą czynniki wi- rulencji, w tym toksyny, do komórek gospodarza. Poprzez pęcherzyki bakterie mogą też modulować odpowiedź odpornościową. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są obiecującymi kandydatami do projektowania szczepionek, mogą być także stosowane jako nośniki leków. W artykule omówiono obecny stan wiedzy dotyczący biogenezy, składu, metod otrzymywa- nia, fizjologicznych funkcji oraz potencjalnych zastosowań pęcherzyków zewnątrzkomórko- wych wydzielanych przez komórki organizmów prokariotycznych.
Słowa kluczowe:	pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, pęcherzyki błonowe, oddziaływania między komórkami bakterii, interakcje gospodarz-mikroorganizm, izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, biogeneza pęcherzyków zewnątrz- komórkowych, lipidomika, proteomika, genomika
Summary:	Extracellular vesicles constitute a heterogeneous group of nanoparticles, released by both prokar- yotic and eukaryotic cells, which perform various biological functions and participate in cell-cell communication. Bacterial extracellular vesicles are made of lipids, proteins and nucleic acids. There are a number of hypotheses for the formation of extracellular vesicles, but the mechanisms of biogenesis of these structures remain unclear. Hardly soluble metabolites or signaling mol- ecules, DNA and RNA are vesicles cargo. Extracellular vesicles have a protective function, they can eliminate other bacterial cells and participate in horizontal gene transfer. The enzymes contained inside the vesicles facilitate the acquisition of nutrients and help colonize various ecological nich- es. Signal molecules carried in the vesicles enable biofilm formation. In the secreted extracellular vesicles pathogenic microorganisms carry virulence factors, including toxins, into the host cells. Via vesicles, bacteria can also modulate the host immune system. Bacterial extracellular vesicles are promising vaccine candidates and can be used as drug carriers. The review discusses the cur- rent knowledge concerning biogenesis, composition, preparation methods, physiological func- tions and potential applications of extracellular vesicles secreted by prokaryotic cells.
Keywords:	extracellular vesicles, membrane vesicles, interactions between bacteria, host-microbe interactions, isolation of extracellular vesicles, biogenesis of extracellular vesicles, lipidomics, proteomics, genomics
--	--
GICID DOI: Word count: Tables: Figures: References:	01.3001.0014.6165 10.5604/01.3001.0014.6165 10 517 1 3 117
Adres autorki:	dr hab. Mariola Paściak, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Pol- skiej Akademii Nauk, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław; e - mail: mariola.pasciak@hirszfeld.pl
Wykaz skrótów:	AFM – mikroskopia sił atomowych (Atomic Force Microscopy), BCA – test kwasu bicinchoninowego (Bicinchoninic Acid Assay), BMV – bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (Bacterial Membrane Vesicles), Cryo-EM – mikroskopia krioelektronowa (Cryogenic Electron Microscopy), ELISA – test immunoenzymatyczny (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), ESI-MS – spektrometria mas z jonizacją typu elektrosprej (Electrospray lonization Mass Spectrometry), EVs – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (Extracellular Vesicles), HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (High-Performance Liquid Chromatography), LPS – lipopolisacharyd (Lipopolysaccharide), MALDI-TOF MS – spektrometria mas z wykorzystaniem jonizacji próbki poprzez desorpcję laserem z matrycy z detekcją czasu przelotu jonów (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation – Time of Flight Mass Spectrometry), MVs – pęcherzyki błonowe (Membrane Vesicles), NGS – sekwencjonowa-nie następnej generacji (Next-Generation Sequencing), OMVs – pęcherzyki zewnątrzbłonowe (Outer Membrane Vesicles), OIMVs – pęcherzyki błony zewnętrznej i wewnętrznej (Outer-Inner Membrane Vesicles), Real-time PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time Polymerase Chain Reaction), SDS PAGE – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących w obecności SDS (Polyacrylamide Gel Electrophoresis), SEM – skaningowa mikroskopia elektronowa (Scanning Electron Microscopy), TEM – transmisyjna mikroskopia elektronowa (Transmission Electron Microscopy), TLC – chromatografia cieczowa (Ultra High-Performance Liquid Chromatography).

WSTĘP

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs – Extracellular Vesicles) tworzą heterogenną grupę nanocząstek, uwalnianych zarówno przez komórki prokariotyczne, jak i eukariotyczne, pełniących zróżnicowane funkcje biologiczne. Pęcherzyki te mają kształt kulisty, natomiast ich średnica wynosi 30–5000 nm [107]. Pęcherzyki otoczone są dwuwarstwą lipidową, która może zawierać elementy strukturalne właściwe dla błon komórek stanowiących źródło ich pochodzenia, w przypadku bakteryjnych EV: błony zewnętrznej bakterii Gramujemnych (fosfolipidy, białka błonowe, lipopolisacharyd), czy błony komórkowej bakterii Gram-dodatnich. Oprócz lipidów i białek, we wnętrzu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych mogą się też znajdować kwasy nukleinowe lub metabolity (ryc. 1).

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą być klasyfikowane w zależności od różnych cech, takich jak: wymiary, pełnione funkcje, mechanizm biosyntezy, rodzaj komórek, z których są uwalniane czy ładunku, który przenoszą. Wśród eukariotycznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wyróżnić można trzy grupy pęcherzyków: egzosomy, mikropęcherzyki oraz ciałka apoptotyczne [31]. Egzosomy



Ryc. 1. Budowa bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

powstają wewnątrzkomórkowo w procesie endocytozy, tworząc tzw. ciałka wielopęcherzykowate (MVBs – Multivesicular Bodies), które następnie są uwalniane z komórki w procesie egzocytozy. Mikropęcherzyki mają większą średnicę od egzosomów i są uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej przez pączkowanie, czyli tworzenie się uwypukleń błony komórkowej. Ciałka apoptotyczne, będące rozmiarowo największymi spośród pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, powstają w wyniku apoptozy komórki i zawierają pozostałości składników komórek, np. cytozolu, zdegradowanych białek, fragmentów DNA oraz organelli komórkowych.

U organizmów prokariotycznych występują jedynie mikropęcherzyki, o średnicach 20–250 nm [15], jednak istnieje kilka typów tych struktur. Najbardziej znanymi są pęcherzyki powstające przez uwypuklenie błony zewnętrznej tzw. OMV (OMV - Outer Membrane Vesicles). U bakterii Gram--ujemnych, oprócz OMV, występują także pecherzyki otoczone dwuwarstwowa błoną zawierające zarówno błonę zewnętrzną, jak i cytoplazmatyczną tzw. "pęcherzyki błony zewnętrznej i wewnętrznej" (OIMV - Outer-Inner Membrane Vesicles). Pecherzyki błonowe bakterii Gram-dodatnich mają inny skład niż bakterii Gram-ujemnych. Ponadto bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą być związane z długimi włóknistymi strukturami łaczącymi komórki, znanymi jako nanopody i nanorurki, określane jako struktury TSMS (tube-shaped membranous structures). Struktury te występują na powierzchni komórek zarówno bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich, tworzą połączenia miedzy komórkami, które umożliwiaja wymiane różnych składników komórkowych i ułatwiają komunikację między komórkami [109].

Zdolność do wytwarzania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest charakterystyczna dla wszystkich przedstawicieli świata żywego: bakterii, archeonów i komórek eukariotycznych. Skoro jest "ewolucyjnie konserwowana" musi być ważna zarówno dla pojedynczych komórek, jak i w oddziaływaniach między różnymi komórkami.

Należy podkreślić, że w opisach dotyczących badań nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi, występują niespójności w nazewnictwie, które mogą wprowadzać chaos i utrudniać dokładne poznanie problemu. Określenie "pęcherzyki zewnątrzkomórkowe" jest bardzo szerokie i dotyczyć może zarówno pęcherzyków uwalnianych przez organizmy prokariotyczne, jak i eukariotyczne. Ze względu na budowę i fizjologię komórek bakteryjnych źródłem pochodzenia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, inaczej mikropęcherzyków (MV – Microvesicles), są błony komórkowe. Używane są rozróżnienia mikropęcherzyków – pęcherzyki zewnątrzbłonowe (OMV – Outer Membrane) Vesicles) w przypadku bakterii Gram-ujemnych, wytwarzajacych pęcherzyki z błony zewnętrznej lub wspomniane już pęcherzyki błony zewnętrznej i wewnętrznej OIMV, natomiast pęcherzyki wytwarzane przez bakterie Gram-dodatnie nazywa się pęcherzykami błonowymi (MV - Membrane Vesicles) lub cytoplazmatycznymi (CMV - Cytoplasmic Membrane Vesicles). Poza tym stosowane są nazwy: BMV (Bacterial Membrane Vesicles) dla odróżnienia od OMV lub inne.

W dalszej części pracy omówiono: historię odkrycia, biogenezy, skład, metody otrzymywania, funkcje oraz przykładowe zastosowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki organizmów prokariotycznych.

HISTORIA ODKRYCIA BAKTERYJNYCH PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Pierwsze doniesienia o bakteryjnych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych sięgają lat sześćdziesiątych ubiegłego stulecia, kiedy to po raz pierwszy zaobserwowano niewielkie, sferyczne cząstki otaczające komórki Escherichia coli, z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego [54]. W 1966 r. w wyniku ekstrakcji w układzie fenol-woda wyizolowano pecherzyki zewnatrzbłonowe pochodzace od Veillonella parvula, które charakteryzowały się zróżnicowana wielkościa i miały podobna budowe do błony zewnętrznej V. parvula [73]. Zaobserwowano również uwalnianie pęcherzyków zewnątrzbłonowych w fazie logarytmicznego wzrostu Vibrio cholerae sugerując, że przyczyną ich wydzielania jest eksport toksyn bakteryjnych do środowiska zewnątrzkomórkowego [16]. Badania wykazały, że w świetle pęcherzyków wytwarzanych przez bakterie Gram-ujemne obecne są białka, lipidy i lipopolisacharydy wywodzące się z macierzystych komórek bakteryjnych. Inne badania wykazały wzmożone uwalnianie pęcherzyków w wyniku stresu komórkowego [96].

Długo uważano, że bakterie Gram-dodatnie ze względu na grubą warstwę peptydoglikanu i brak błony zewnętrznej nie wytwarzają pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Pierwsza praca dokumentująca istnienie pęcherzyków u *Staphylococcus aureus* powstała w 1990 r., natomiast opisanie ich składu białkowego nastąpiło w 2009 r. [62]. Od tego czasu, badania prowadzone nad innymi przedstawicielami bakterii Gram-dodatnich, wykazały istnienie pęcherzyków u wielu gatunków, m.in. *Bacillus subtilis, B. anthracis* [92], *Streptomyces coelicolor* [100] *Clostridium perfringens* [44] i *Streptococcus pneumoniae* [76].

Obecnie wraz z rozwojem metod analitycznych oraz technik biologii molekularnej i mikroskopii elektronowej, wykazano obecność pęcherzyków zewnątrzkomórkowych u wielu gatunków bakterii. Ich znaczenie w funkcjonowaniu mikroorganizmów w różnych warunkach wzbudza ogromne zainteresowanie, szczególnie ich możliwych aplikacji klinicznych.

BIOGENEZA BAKTERYJNYCH PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe różnią się strukturą i składem, a niektóre z tych różnic można wyjaśnić różnymi mechanizmami biogenezy.

Bakterie Gram-ujemne

Uważa się, że drobnoustroje Gram-ujemne uwalniają pęcherzyki zewnątrzbłonowe w wyniku pączkowania z otaczającej ich komórki błony zewnętrznej. Już w pierwszych badaniach wykazano, że zawartość lipidów, profil białkowy, a także swoista aktywność niektórych enzymów w pęcherzykach błonowych pochodzących z *E. coli* jest zbliżona do tych, które znajdują się w błonie zewnętrznej tych bakterii. W pęcherzykach zewnątrzbłonowych wykryto mnieisza liczbe białek, w tym lipoprotein, niż w zewnetrznej błonie komórkowej, co pozwoliło wnioskować, że pęcherzyki te mogą pochodzić z jej specyficznego regionu [39]. Białko OmpA (OmpA - Outer membrane protein A) jest transbłonowym białkiem wchodzącym w skład błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych, N-koniec tego białka znajduje się na zewnatrz komórki, podczas gdy C-koniec łączy się z peptydoglikanem. Uważa się, że OmpA jest zakotwiczone w peptydoglikanie poprzez niekowalencyjne oddziaływanie z kwasem diaminopimelinowym, który sieciuje dwa sąsiednie peptydy z peptydoglikanem bakterii Gram--ujemnych [81, 103]. Wykazano, że brak białka OmpA prowadzi do nasilania uwalniania pęcherzyków zewnątrzbłonowych u różnych gatunków drobnoustrojów. Na podstawie tych obserwacji zaproponowano schemat biogenezy pęcherzyków, który zakłada, że w wyniku deficytu niektórych białek związanych z osłoną komórkową, takich jak lipoproteiny czy OmpA, w określonym miejscu w błonie zewnętrznej dochodzi do osłabienia wiązania pomiędzy peptydoglikanem a błoną zewnętrzną. W efekcie, w błonie zewnętrznej powstaje uwypuklenie i w konsekwencji dochodzi do wytworzenia pęcherzyka zewnatrzkomórkowego [75]. Obecnie uwzglednia się kilka prawdopodobnych mechanizmów biogenezy pecherzyków zewnątrzkomórkowych. Pierwszy z nich zakłada zerwanie bądź przegrupowanie kowalencyjnych wiązań pomiędzy molekułami błony zewnętrznej, a leżącą poniżej warstwą peptydoglikanu, co powoduje uwypuklenie błony zewnętrznej i generowanie pęcherzyka [56, 58]. Według innej hipotezy, akumulacja fragmentów peptydoglikanu oraz nieprawidłowości w pofałdowaniu białek, przyczyniają się do generowania wyższego ciśnienia w przestrzeni peryplazmatycznej, co powoduje powstanie wybrzuszenia w błonie zewnętrznej [38]. Odmienny model biogenezy pęcherzyków bakterii Gram--ujemnych zakłada represję lub wyciszenie genów VacJ/ Yrb związanych z transportem i gromadzeniem fosfolipidów w zewnętrznej warstwie błony zewnątrzkomórkowej. Dochodzi do jej asymetrycznego rozszerzenia, a następnie uwypuklenia i powstania pęcherzyka zewnątrzbłonowego [2, 95]. U bakterii zawierających wić komórkową osłoniętą błoną zewnętrzną, np. Alivibrio fisherii istnieje mechanizm wytwarzania pęcherzyków w wyniku rotacji wici [109].

W 2013 r. po raz pierwszy wykazano, że wyizolowane z Antarktyki bakterie *Shewanella vesiculosa*, wytwarzają dwa rodzaje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych: tradycyjne OMV i pęcherzyki zbudowane z podwójnej błony lipidowej: zawierające zarówno błonę zewnętrzną, jak i cytoplazmatyczną, nazwane OIMV [82]. Autorzy oszacowali, że OIMV stanowią jedynie 0,1% wydzielanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W późniejszych badaniach OIMV wykryto też u innych bakterii Gram-ujemnych, u *Pseudoalteromonas marina* i te nanostruktury stanowiły prawie połowę wykrywanych pęcherzyków [109]. Niewiele wiadomo o mechanizmach biogenezy tych struktur, zwłaszcza w odniesieniu do różnic między nimi a klasycznymi OMV. Niedawne badania wykazały, że komórki *Stenotrophomonas maltophilia* wytwarzały zarówno OMV, jak i OIMV po traktowaniu cyprofloksacyną [25, 109]. W rzeczywistości możliwe jest, że wszystkie bakterie Gram-ujemne oprócz OMV wytwarzają również OIMV i że te nanostruktury zostały niedostatecznie zbadane z powodów metodologicznych.

Jedna z możliwości powstawania pęcherzyków OIMV może być eksplodująca (wybuchowa) liza komórek spowodowana działaniem endolizyn. Bakteriofagi kodują endolizyny, które degradują peptydoglikan ściany komórkowej i przez to ułatwiają rozprzestrzenianie się fagów potomnych. Profagi wbudowuja sie w bakteryjny genom i w odpowiednich warunkach przechodzą ze stanu lizogennego w stan lityczny. Stres komórkowy spowodowany ekspozycją na czynniki uszkadzające DNA, np. promieniowanie ultrafioletowe, wyzwala odpowiedź SOS powodującą aktywację profaga prowadzącą do degradacji bakteryjnego DNA, uszkodzenia peptydoglikanu, a w konsekwencji do lizy komórki. U P. aeruginosa uszkodzenie DNA wywołuje ekspresję endolizyn powodującą zniszczenie warstwy peptydoglikanu, komórki stają się kuliste i eksplodują. Pozostałe fragmenty błon samoorganizują się w postaci pęcherzyków, które moga też zawierać DNA i białka cytoplazmatyczne [109].

Bakterie Gram-dodatnie

W związku z grubą warstwą peptydoglikanu budującą ścianę komórkową bakterii Gram-dodatnich mechanizm powstawania mikropęcherzyków pozostaje ciągle niewyjaśniony. Dotychczas zaproponowano trzy hipotezy biogenezy. Pierwsza z nich zakłada, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są "przeciskane" przez ścianę komórkową z wykorzystaniem ciśnienia turgorowego po uwolnieniu z błony plazmatycznej. Zarówno wielkość porów, jak i grubość ściany komórkowej mają wpływ na regulację rozmiaru pęcherzyków i ich zdolność do przechodzenia przez ścianę komórkową [114]. Kolejna hipoteza oparta jest na działaniu enzymów, które uwolnione z pęcherzyków, mogą wpływać na modyfikację ściany komórkowej, powodując jej "poluzowanie" i zwiększając w ten sposób rozmiar porów, ułatwiają przejście kolejnych pęcherzyków. Wykazano, że pęcherzyki błonowe zawierały enzymy zdolne do modyfikacji ściany komórkowej, co jest argumentem wspierającym tę hipoteze [62].

Enzymatyczna aktywność endolizyn u *Bacillus subtilis* nie powoduje eksplodującej lizy komórek, tylko wytwarza szczeliny w peptydoglikanie, przez które mogą się przeciskać pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Mechanizm ten może prowadzić do śmierci komórki z powodu utraty integralności błony komórkowej i jest nazywany "bubbling cell death" [109].

Istnieje także możliwość, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydostają się do środowiska pozakomórkowego za pomocą białek cytoszkieletu oraz kanałów transbłonowych. Hipoteza jest oparta na wynikach badań proteomicznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez grzyby, które zawierały tubulinę i/lub aktynę jako strukturalne składowe kanałów transbłonowych [14, 114].

Mycobacterium

Chociaż prątki należą do bakterii Gram-dodatnich, to wyróżniają się charakterystyczną tylko dla mykobakterii złożoną budową osłon komórkowych. Ściana komórkowa składa się z peptydoglikanu związanego kowalencyjnie z arabinogalaktanem oraz kwasami mikolowymi i interkalującymi wolnymi lipidami, które tworzą dwuwarstwę lipidowa nazywana egzomembrana pratkowa lub mykomembrana [21]. Ścianę komórkowa otacza kapsuła złożona z polisacharydów, białek oraz lipidów. Ze względu na swoistą budowę, wyjaśnienie mechanizmu uwalniania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez mykobakterie, podobnie jak w przypadku bakterii Gram-dodatnich, stanowi duże wyzwanie. Mycobacterium tuberculosis hodowane w warunkach niedoboru żelaza obficiej wytwarzają pęcherzyki błonowe, co może wskazywać, że ich biogeneza jest regulowana przez dostępność/podaż żelaza. Prątki hodowane w warunkach obniżonej podaży żelaza wytwarzają duże ilości lipidowego sideroforu, czyli mykobaktyny, która gromadzi sie na powierzchni komórki [87, 89, 94]. Interakcje mykobaktyny z błona komórkowa moga bezpośrednio lub pośrednio stymulować biogenezę pęcherzyków. Wykazano, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe uwolnione w warunkach niedoboru żelaza zawierały mykobaktyne, co było poparciem tej hipotezy [84].

METODY IZOLACJI I TECHNIKI ANALITYCZNE STOSOWANE W ANALIZIE BAKTERYJNYCH PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe można wyizolować z płynnego medium hodowlanego. W tym celu najczęściej stosuje się ultrawirowanie, które umożliwia rozdział mieszaniny w zależności od wielkości i gęstości składowych poprzez działanie siły odśrodkowej. Pierwszym etapem izolacji jest zwykle wirowanie z prędkością 4000-6000 x g, mające na celu usunięcie większych zanieczyszczeń, takich jak komórki bakteryjne czy pozostałości martwych komórek. Następnie pozyskany w wyniku wirowania supernatant, poddaje się sączeniu przez sączki o wielkości porów 0,22 µm i ponownie wiruje z prędkościa 150000 x g. Uzyskaną frakcję pęcherzyków zewnątrzkomórkowych można dodatkowo oczyścić za pomocą ultrawirowania w gradiencie gęstości [30, 36, 53, 65]. Poza ultrawirowaniem, także ultrafiltracja może stanowić istotne narzędzie wspomagające pozyskanie i oczyszczanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Jest to technika, której siłę napędową stanowi wysokie ciśnienie roztworu rozdzielanego. Proces filtracji przebiega z użyciem sit molekularnych oraz membran zawierających pory o średnicy zbliżonej do średnic pojedynczych cząsteczek. Ekstrakcja pęcherzyków z zastosowaniem tej metody jest możliwa w połączeniu z ultrawirowaniem [65, 104] (ryc. 2). Dodatkowymi metodami izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, wymagającymi jednoczesnego stosowania wymienionych wyżej technik jest metoda oparta na

Metoda analizy									
Mikroskopia	Lipidomika	Proteomika	Genomika						
TEM	TLC / HPLC / UHPLC	Test BCA	NGS						
SEM	MALDI-TOF MS	SDS/PAGE	Real-time PCR						
Cryo-EM	ESI-MS	Western blotting	elektroforeza kapilarna						
AFM		ELISA							
		Metody kolorymetryczne							

precypitacji białek za pomocą 71 lub 75% siarczanu amonu [65]. W celu wyodrębnienia określonych cząsteczek zawartych w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych możliwe jest także wykorzystanie chromatografii powinowactwa (np. oddziaływania antygen-przeciwciało) [7]. Przegląd różnych metod stosowanych do analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zebrano w tabeli 1.

SKŁAD PĘCHERZYKÓW

Lipidy

Charakterystyczną cechą niektórych lipidów np. glikofosfolipidów jest zdolność do tworzenia w środowisku wodnym uporządkowanych struktur - miceli lub dwuwarstwowych pęcherzyków. Lipidy bakteryjne mają wspólny szkielet zbudowany najczęściej z glicerolu, rzadziej ze sfingozyny, związki modyfikujące szkielet (cholina, etanoloamina lub cukry) oraz kwasy tłuszczowe. Kwasy tłuszczowe moga być nasycone lub nienasycone, rozgałęzione lub o prostym łańcuchu albo zawierać grupy cyklopropanowe. Analiza lipidów pozwala na pozyskanie fundamentalnych informacji na temat struktury i biochemicznych właściwości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Za pomocą technik analitycznych, takich jak spektrometria mas czy chromatografia można wykrywać obecność ugrupowań polarnych w strukturze lipidu, wiązań podwójnych i długości łańcuchów kwasów tłuszczowych. Najczęściej występującym w bakteryjnych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych typem lipidów są fosfoglicerolipidy oraz glicerolipidy. Pecherzyki zewnatrzbłonowe bakterii Gram-ujemnych zawieraja duże ilości lipopolisacharydów. Jak już wspomniano, skład lipidowy pęcherzyków E. coli oraz stosunek fosfolipidy /białka był bardzo zbliżony do składu błony zewnętrznej E. coli. Jednak, stosunek nienasyconych kwasów tłuszczowych do cyklopropanowych kwasów tłuszczowych był znacznie wyższy w OMV E. coli, niż w błonie zewnętrznej. Ze względu na to, że nienasycone kwasy tłuszczowe zastępowane są cyklopropanowymi gdy komórki wchodzą w fazę stacjonarną, autorzy sugerują, że badane pęcherzyki zewnątrzbłonowe zostały uwolnione z komórek w fazie wykładniczego wzrostu [39, 75]. W biogenezie pęcherzyków duże znaczenie mają struktury ugrupowań



Ryc. 2. Izolacja i oczyszczanie bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

kwasów tłuszczowych, przede wszystkim ze względu na ich wpływ na sztywność i płynność błony lipidowej. Oprócz kwasów tłuszczowych istotne sa również lipidy polarne, które biorą udział w ustaleniu konformacji błony. Fosfatydyloetanoloamina (PE) jest typowym lipidem o kształcie stożka, który może powodować zakrzywianie błony przez skupianie się lub sekwestrację [1]. W badaniach pęcherzyków zewnątrzbłonowych Haemophilus influenzae porównywano właściwości szczepu dzikiego z mutantem wykazującym zwiększone wydzielanie pęcherzyków w wyniku mutacji transportera fosfoglicerolipidów. Wykazano, że zawartość PE w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych mutanta była dwukrotnie wyższa niż w przypadku szczepu dzikiego [95]. Różnice w zawartości PE między pęcherzykami zewnatrzbłonowymi a błona zewnetrzna opisano również u Pseudomonas aeruginosa [105]. Lokalne i asymetryczne gromadzenie lub wyczerpywanie PE w warstwie błony może powodować zmiany strukturalne błon lipidowych, które ostatecznie mogą prowadzić do uwypukleń błony zewnętrznej komórki bakteryjnej, a w następstwie do uwolnienia pęcherzyków [75]. Stosunkowo niewiele badań składu lipidowego wykonano dla mikropęcherzyków bakterii Gram-dodatnich. W pęcherzykach zewnątrzkomórkowych Streptococcus pyogenes wykryto różnice w zawartości i składzie kwasów tłuszczowych specyficznych lipidów w porównaniu do błony komórkowej bakterii [91]. Stwierdzono, że pęcherzyki były wzbogacone

w fosfatydyloglicerol (PG) i uboższe w kardiolipinę (CL), fosfolipid powodujący zakrzywienie błony. Wyniki te wskazują na istnienie uporządkowanego mechanizmu odpowiedzialnego za biogenezę pęcherzyków bakterii Gram-dodatnich. W 2018 r. wykonano analizę lipidomiczną pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i komórek Propionibacterium acnes (obecnie Cutibacterium acnes) za pomocą tandemowej spektrometrii mas [43]. Zidentyfikowano 214 różnych lipidów, z tego 187 lipidów było wspólnych dla komórek i pęcherzyków. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe P. acnes zawierały więcej fosfatydylocholin (PC), diacylogliceroli (DG), kwasów fosfatydowych (PA), fosfatydyloetanoloamin (PE), kwasów lizofosfatydowych (LPA), lizofosfatydylocholin (LPC) oraz monoacylogliceroli (MG), niż komórki P. acnes. Cechą znamienną pęcherzyków pochodzących od P. acnes jest znacząco zredukowana liczba triacylogliceroli (TG) w porównaniu do komórek. Wyniki te sugerują, że biochemiczne i fizyczne właściwości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych P. acnes, mogą się znacznie różnić od właściwości błony komórkowej tych bakterii [43].

W pęcherzykach wydzielanych przez aktynobakterie zawierające kwasy mikolowe, m.in. *M. tuberculosis* czy *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) wykryto znaczne ilości lipoprotein, w tym ligandy TLR2. Ponadto lipidy, które uległy ekstrakcji z pęcherzyków szczepów *M. bovis* BCG stanowiły głównie lipidy polarne, takie jak PE czy fosfatydyloinozytolodimannozydy (Ac2PIM2), nie wykryto natomiast estrów kwasów mikolowych. Mając na uwadze to, że estry kwasów mikolowych zakotwiczone są przede wszystkim w zewnętrznej błonie mykobakterii, podejrzewa się, że badane pęcherzyki prątków pochodziły z błony wewnętrznej [83]. W warunkach ograniczonej podaży żelaza acylowane glicerydy oraz PE występowały w większej ilości, natomiast w warunkach optymalnej podaży żelaza znajdowano głównie acylowane glicerydy, stanowiące ważny komponent ściany komórkowej *Mycobacterium* [75, 83, 84, 93].

Białka

Bakterie Gram-ujemne uwalniają pęcherzyki zewnątrzbłonowe, w których licznie występują białka pochodzące z cytoplazmy, błony wewnętrznej, peryplazmy i błony zewnętrznej. Analizy ilościowe wykazały, że w pęcherzykach zewnątrzbłonowych wydzielanych przez E. coli znajdowało się 0,2-0,5% białek błony zewnętrznej oraz przestrzeni peryplazmatycznej [13, 39, 49, 74]. Analizy proteomiczne wskazują na obecność w świetle pęcherzyków elementów pochodzących z komórek bakteryjnych, takich jak agregaty białkowe. Zgodnie z modelem biogenezy, w którym pecherzyki powstają przez uwypuklenie błony zewnętrznej, białka cytoplazmatyczne nie powinny się znajdować w pęcherzykach OMV. Często jednak znaczne liczby białek cytoplazmatycznych były wykrywane nawet w starannie oczyszczonych frakcjach pęcherzyków zewnątrzkomórkowych [11, 57, 77]. Kadurugamuwa i Beveridge zasugerowali, że zlokalizowane i przejściowe pęknięcia peptydoglikanu, katalizowane przez autolizynę prowadzą do powstania pęcherzyków zewnątrzbłonowych zawierających struktury białkowe charakterystyczne dla cytoplazmy, a także zewnętrznej oraz wewnętrznej błony komórek P. aeruginosa [20, 45]. Eksplodująca liza komórek wyzwalana przez fagowe endolizyny powoduje powstanie OIMV i może wyjaśniać obecność białek cytoplazmatycznych u bakterii Gram-ujemnych. Natomiast pęcherzyki zewnątrzkomórkowe bakterii Gram-dodatnich zawierają białka cytoplazmatyczne, niekiedy są nawet nazywane cytoplazmatycznymi pęcherzykami błonowymi.

Analiza proteomu pęcherzyków błonowych wydzielanych przez Brucella abortus 2308 oraz RB51, wykonana z zastosowaniem SDS-PAGE w połączeniu z chromatografią cieczową, umożliwiła zidentyfikowanie białek, takich jak: SodC, Omp2b, Omp2a, Omp10, Omp16 i Omp19, które sa czynnikami wirulencji Brucella. W przypadku szczepu B. abortus 2308 pecherzyki błonowe zostały wzbogacone białkami biorącymi udział w przetwarzaniu informacji o środowisku, metabolizmie węglowodanów i aminokwasów oraz biorącymi udział w procesach genetycznych. Natomiast pęcherzyki szczepu B. abortus RB51 zawierały białka zaangażowane w metabolizm lipidów, cykl komórkowy i przetwarzanie informacji genetycznej [9]. Analiza proteomiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych P. acnes wykazała obecność białek zaangażowanych w procesy biochemiczne, oporność na antybiotyki, konkurencję bakteryjną, przyleganie komórek, zjadliwość i immunogenność [43]. Białka zawarte w pęcherzykach bakteryjnych pełnią zróżnicowane funkcje. Wiele z nich to czynniki wirulencji, które odgrywają rolę w inwazji, adhezji, oporności na antybiotyki, uszkodzeniu komórek gospodarza, tworzeniu biofilmu i promocji zjadliwości. Bakterie chorobotwórcze mogą umieszczać toksyny wewnątrz pęcherzyków i w ten sposób dostarczać je do komórek gospodarza, np. toksyna Shiga (*Shigella desynteriae*), toksyna cholery (*V. cholerae*). Inne białka mogą uczestniczyć w kooperacji międzygatunkowej oraz komunikacji międzykomórkowej [13].

Kwasy nukleinowe

Kwasy nukleinowe mogą się znajdować we wnętrzu lub na powierzchni pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez drobnoustroje. U bakterii Gram-ujemnych większość wykrywanego DNA znajdowano na zewnętrznych powierzchniach OMV [12]. Wykazano, że DNA zawarte w OMV jest pochodzenia chromosomalnego i mogą to być geny kodujące produkty związane z wirulencją, geny kodujące oporność na antybiotyki, metabolizm i syntezę błon. W pęcherzykach wydzielanych przez bakterie Gram-dodatnie również znaleziono DNA m.in. *Clostridium perfringens* [44], Streptococcus spp. [68, 91] i Lactobacillus reuteri [33]. W pecherzykach błonowych wydzielanych przez C. perfringens wykryto 100-nukleotydowy fragment 16S RNA oraz gen toksyny alfa i perfrinolizyny [44]. Choć nie jest pewne, w jaki sposób DNA jest pakowane do wnętrza pęcherzyków, zawartość DNA w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych Streptococcus spp. zmienia się na różnych etapach wzrostu, co sugeruje, że proces ten może być regulowany podczas wzrostu bakterii [68]. W bakteryjnych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych identyfikuje się ponadto różne typy RNA, tj. rRNA, mRNA, tRNA i sRNA (small RNA, mały RNA). Bardzo często występują tylko krótkie sekwencje RNA o długości do 250 nukleotydów [111], które dostają się do światła pęcherzyków najprawdopodobniej w czasie ich biogenezy. RNA jest "zaciągane" do wnętrza tworzącego się pęcherzyka wraz z cytoplazmą, podczas gdy mechanizmy pobierania DNA nadal pozostają niejasne. Dokładny mechanizm transportu fragmentów DNA do przestrzeni peryplazmatycznej, skąd "odpączkowują" pęcherzyki pozostaje nadal nieznany. Możliwe, że swobodnie dyfundujący DNA zostaje wchłaniany do peryplazmy z przestrzeni zewnątrzkomórkowej [60, 90, 101]. Struktura pęcherzyka – otoczenie przez dwuwarstwę lipidową – chroni kwasy nukleinowe przed degradacją przez nukleazy, co ułatwia ich dostarczenie do komórek docelowych. Wykazano, że RNA zawarte w pecherzykach jest funkcjonalne, gdyż po jego dostarczeniu w komórkach docelowych obserwowano zmiany fenotypowe [23]. Udokumentowano także, że pęcherzyki mogą pośredniczyć w horyzontalnym transferze genów między bakteriami, co podkreśla ich rolę jako nośników informacji genetycznej. Badania wskazują też na rolę pęcherzyków w komunikacji między komórkami różnych gatunków bakterii dzięki obecności cząsteczek sygnałowych quorum sensing informujących o stanie zagęszczenia populacji. W pęcherzykach błonowych wydzielanych przez patogeny Porphyromonas gingivalis i Treponama denticola wykryto sRNA, który hamował ekspresję niektórych cytokin w komórkach T – Jurkat [18]. Uważa się, że EV są ważnym

źródłem mikrobiologicznego RNA, który może modulować odpowiedź odpornościową podczas infekcji. Warto podkreślić, że mRNA drobnoustrojów wykryte w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych są klasyfikowane jako vita-PAMP (wzorce molekularne związane z patogenem), ponieważ świadczą o żywotności drobnoustrojów [98].

REGULACJA GENETYCZNA

Nadal brakuje jednoznacznych danych dotyczących regulacji genetycznej wydzielania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez bakterie. Za pomocą badań przesiewowych zidentyfikowano geny wpływające na wytwarzanie pęcherzyków przez *E. coli* [72]. Jak dotąd nie udało się jednak wyizolować mutanta, który nie uwalniałby pęcherzyków zewnątrzbłonowych, co wskazuje, że ich tworzenie jest jedynie częściowo regulowane genetycznie i może być inicjowane przez procesy fizyczne i biochemiczne.

Równie niewiele jest informacji na temat regulacji genetycznej biogenezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych bakterii Gram-dodatnich. Badania wskazuja, że w regulację mechanizmów biogenezy pęcherzyków u Listeria monocytogenes zaangażowany jest czynnik transkrypcji oB [63]. Doświadczenia prowadzono na szczepie dzikim L. monocytogenes i mutancie delecyjnym w genie sigB, kodującym alternatywny czynnik sigma polimerazy RNA oB. Czynnik ten jest głównym regulatorem odpowiedzi na stres w komórkach Listeria. Odpowiada także za ekspresję internaliny B (InlB), która jest kluczowa dla inwazji bakteryjnej oraz ekspresję pozytywnego regulatora transkrypcji A (PrfA) wpływającego na biosyntezę listeriolizyny O [80]. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wyizolowane z dzikiego szczepu L. monocytogenes zawierały trzykrotnie więcej InlB, niż pecherzyki pochodzące ze zmutowanego szczepu σB. Ekspresja listeriolizyny O związana z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi pozostawała taka sama w obu szczepach wskazując, że σB może się przyczyniać do regulacji ich zawartości [63]. Mutacja czynnika σB zmniejszała wytwarzanie pęcherzyków, a powstające struktury były zdeformowane w porównaniu do pęcherzyków szczepu dzikiego. Różnice te sugerują, że czynnik σB odgrywa rolę w biogenezie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych L. monocytogenes [14].

Natomiast w komórkach *M. tuberculosis* gen *rv0431* odpowiada m.in. za regulację uwalniania pęcherzyków i z tego powodu został nazwany *virR* (vesiculogenesis and immune response regulator). Produkt tego genu – VirR jest cytoplazmatycznym białkiem, które kontroluje biogenezę pęcherzyków i reguluje uwalnianie czynników immunomodulujących. Białko to oddziałuje z błoną komórkową i co najmniej jedną lipoproteiną zawartą w pęcherzykach. Jednocześnie jest ono częścią złożonego kompleksu białkowego, który kontroluje tworzenie się pęcherzyków i selekcję ich zawartości [88]. Związek między VirR, a zależną od żelaza regulacją wytwarzania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wymaga dalszych badań. Wiadomo, że ekspresja virR jest obniżona w odpowiedzi na niedobór żelaza [59]. Jest zatem możliwe, że obniżona ekspresja przyczynia się do wzmożonego wytwarzania pęcherzyków przez M. tuberculosis, przy ograniczonej dostępności żelaza [35].

Należy podkreślić, że na tworzenie pęcherzyków zewnątrz komórkowych mają także wpływ różne czynniki zewnętrzne, m.in. skład pożywki, faza wzrostu, temperatura, dostępność tlenu czy żelaza oraz ekspozycja na antybiotyki [109].

UDZIAŁ PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH W ODDZIAŁYWANIACH MIĘDZY KOMÓRKAMI BAKTERII

Choć pierwotnie pęcherzyki uznawano za komórkowe odpady lub produkty "odnawiania" błon, to kolejne wyniki badań wykazały, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu komórek bakteryjnych i interakcjach między nimi. Liczne biologiczne szlaki sygnałowe funkcjonują dzięki cząsteczkom syntetyzowanym przez komórki, a następnie uwalnianiu ich do środowiska pozakomórkowego. Często są one trudno rozpuszczalne bądź nietrwałe oraz wymagają odpowiedniego stężenia i ukierunkowania w celu zapewnienia prawidłowej transmisji sygnału. Dlatego też komórki bakteryjne mają zdolność "kapsułkowania" tych biocząsteczek wewnątrz mikropęcherzyków, które są wydzielane na zewnątrz komórki [15].

Funkcja ochronna

Istotną funkcją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez bakterie jest ochrona "społeczności drobnoustrojów" przed szkodliwymi dla nich czynnikami, m.in.: reaktywnymi formami tlenu, antybiotykami czy bakteriofagami. Przykładem takiej aktywności mogą być pęcherzyki zewnątrzbłonowe *Helicobacter pylori* stanowiące mechanizm ochronny przed reaktywnymi formami tlenu uwalnianymi przez komórki układu immunologicznego gospodarza np. makrofagi czy granulocyty. Pęcherzyki pochodzące z różnych szczepów *H. pylori* wykazywały selektywne wzbogacenie w katalazę (KatA) w porównaniu do zewnętrznej błony komórkowej, co powodowało ich większą aktywność pęcherzyków pozwala na ochronę drobnoustrojów przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [64].

Jak już wspomniano, "ładunek" transportowany przez pęcherzyki może zawierać białka pełniące zróżnicowane funkcje, w tym enzymy. Jednym z nich jest enzym OXA-58 należący do klasy D β -laktamaz warunkujący oporność szczepów *Acinetobacter baumannii* na antybiotyki z grupy karbapenemów [69] (ryc. 3). Jak już wspomniano pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą pośredniczyć w horyzontalnym transferze genów. DNA niosący liczne geny kodujące β -laktamazy *A. baumannii*, może zostać przekazany nie tylko komórkom tego samego gatunku, ale także innym gatunkom, np. komórkom *E. coli*, przyczyniając się do szerzenia oporności na antybiotyki [17, 97]. Badania z udziałem patogennych *E. coli* O157:H7 wykazały, że zarówno liniowe chromosomalne DNA jak i plazmidy mogą być "upakowane" we wnętrzu pęcherzyków



Ryc. 3. Przykłady oddziaływań bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórkami prokariotycznymi i eukariotycznymi

i przenoszone do komórek szczepów niepatogennych zwiększając ich wirulencję oraz generując antybiotykooporność [15, 116].

Pozyskiwanie substancji odżywczych

Uwalnianie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez bakterie pozwala na przekazywanie substancji potrzebnych do funkcjonowania drobnoustrojów zarówno tego samego jak i innych gatunków zasiedlających tę samą niszę. W ludzkim mikrobiomie jelitowym licznie występują bakterie z rodzaju Bacteroides, a każdy z gatunków ma odmienne możliwości wykorzystania polisacharydów pochodzących z treści jelitowej [26]. Zależy to od genów określanych jako PUL (polysaccharide utilization loci), które koduja białka powierzchniowe i regulatorowe, zdolne do wiązania, rozszczepiania lub importowania określonych polisacharydów oraz produktów ich rozkładu do postaci łatwiej przyswajalnych przez bakterie oraz komórki nabłonka jelitowego [86] (ryc. 3). Porównawcza analiza proteomiczna pęcherzyków zewnątrzbłonowych i błon zewnętrznych u Bacteroides fragilis i B. thetaiotaomicron umożliwiła zidentyfikowanie grup białek znajdujących się wyłącznie w pęcherzykach zewnątrzbłonowych lub błonie zewnętrznej. Białka pęcherzyków były szczególnie wzbogacone w kodowane przez PUL kwaśne lipoproteiny o aktywności hydrolitycznej i zdolności wiązania węglowodanów [26, 113]. Pozwala to na rozkład polisacharydów, a powstałe produkty mogą być metabolizowane przez wszystkie obecne w pobliżu szczepy bakterii, również niewytwarzające pęcherzyków. Takie wzbogacenie pęcherzyków w enzymy hydrolityczne kodowane przez geny PUL sugeruje istnienie mechanizmu selektywnego upakowywania niektórych białek w celu zapewnienia działania poza komórką [15, 26].

Antagonizm między mikroorganizmami

Uwalnianie pęcherzyków przez bakterie może stanowić skuteczną broń przeciwko innym drobnoustrojom. Taki mechanizm zachodzi m.in. u P. aeruginosa, który wytwarza pęcherzyki zewnatrzbłonowe zawierające liczne czynniki wirulencji w celu eliminowania komórek gospodarza oraz innych komórek bakteryjnych, np.: proteazy, hemolizyny, fosfolipazę C, fosfatazy alkaliczne oraz chinolony i hydrolazy mureinowe [66, 71, 106]. Hydrolazy peptydoglikanu zawarte w pecherzykach zewnatrzbłonowych moga rozkładać peptydoglikan ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich prowadząc do lizy komórki [46, 47] (ryc. 3). Natomiast w kontakcie z innymi bakteriami Gram-ujemnymi następuje fuzja pęcherzyków P. aeruginosa z błoną zewnętrzną komórek gatunku antagonistycznego i uwolnienie z ich wnętrza enzymów trawiących i toksyn do peryplazmy [15, 67]. Innym przykładem może być bakteriocyna zawarta w pęcherzykach błonowych Lactobacillus acidophilus, która hamuje wzrost i podziały komórkowe innego konkurencyjnego szczepu Lactobacillus (L. delbrueckii) znajdującego się w mikrobiomie jelitowym [24].

Udział w rozprzestrzenianiu się bakteriofagów

Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą także pośredniczyć w rozprzestrzenianiu się bakteriofagów. Wymiana receptorów fagów może zachodzić w sposób międzygatunkowy, ułatwiając w ten sposób przyłączanie się fagów do gatunków innych niż komórki gospodarza. Komórki *Bacillus subtilis* oporne na fagi stały się wrażliwe, otrzymując receptory fagowe przenoszone przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe generowane z wrażliwych szczepów bakterii [112]. Ponadto, wewnątrz pęcherzyków wydzielanych przez *B. subtilis* znaleziono cząstki fagowe które mogą potencjalnie stanowić nową drogę przedostawania się fagów do innych szczepów bakterii [108].

Udział pęcherzyków w funkcjonowaniu biofilmu

Pęcherzyki zewnątrzbłonowe mogą również zawierać hydrofobowe cząsteczki odpowiedzialne za komunikację między poszczególnymi komórkami tzw. sygnały "quorum sensing" i tworzenie biofilmu. Takie silnie hydrofobowe cząsteczki, nierozpuszczalne w roztworach wodnych, zamknięte w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, moga sie przemieszczać na duże odległości i pośredniczyć w przekazywaniu informacji między komórkami bakterii. Przykładem takiej cząsteczki może być PQS (pseudomonas quinolone signal), lakton homoseryny. PQS reguluje ekspresję wielu genów odpowiedzialnych za ruchliwość, wirulencję i tworzenie biofilmu. Komunikacja odbywa się w wyniku fuzji pęcherzyków z komórką docelową i uwolnienia cząsteczek sygnałowych. Co ciekawe quorum sensing zaobserwowano również u bakterii Gram-dodatnich - B. subtilis [110].

Pęcherzyki zewnątrzbłonowe są ważnym składnikiem macierzy biofilmu wielu gatunków bakterii, w tym P. aeruginosa, H. pylori i Myxococcus xanthus [79, 99, 117] (ryc. 3). Biofilmy bakteryjne często składają się ze społeczności, które mogą zawierać wiele różnych gatunków drobnoustrojów. W takiej strukturze, jeden gatunek bakterii, jako element macierzy biofilmu może przynosić innemu gatunkowi korzyści w postaci pozyskiwania składników odżywczych lub zwiększonych szans na przeżycie. Relacje takie przyczyniają się do poprawy ogólnej funkcji biofilmu [15, 29, 99]. P. aeruginosa wydziela inne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (różnice ilościowe i jakościowe) z komórek planktonicznych, a inne z komórek rosnących w postaci biofilmu. Pęcherzyki te wykazują aktywność proteolityczną i zdolność wiązania antybiotyków, co wskazuje na ich udział w tworzeniu biofilmów [99]. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzące z komórek komensalnych bakterii Lactobacillus reuteri, z hodowli planktonicznej i rosnących w postaci biofilmu zawierały DNA i miały różne rozmiary [33]. W biofilmach tworzonych przez P. aeruginosa obecne są pęcherzyki zawierające DNA, który jest uwalniany specyficznie, w późnej fazie logarytmicznego wzrostu hodowli w odpowiedzi na sygnały quorum sensing. Proces ten zachodzi prawdopodobnie przez lizę pęcherzyków zewnątrzbłonowych zawierających DNA [4]. Zdolność do tworzenia biofilmu szczepu H. pylori TK1402, w porównaniu do innych szczepów tego gatunku, była skorelowana z wytwarzaniem pęcherzyków zewnątrzbłonowych [117]. Zaobserwowano też, że pęcherzyki zewnątrzbłonowe z jednego organizmu mogą również ułatwiać adhezję innych organizmów do biofilmu; na przykład pęcherzyki patogenu jamy ustnej *Porphyromonas gingivalis* mogą zwiększać agregację i adhezję wielu innych mikroorganizmów jamy ustnej w biofilmach płytki nazębnej [15, 48, 102].

UDZIAŁ PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH W ODDZIAŁYWANIACH MIĘDZY KOMÓRKAMI EUKARIOTYCZNYMI

Bakterie patogenne wydzielają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, zawierające czynniki wirulencji lub inne modulatory komórkowe. Ich wytwarzanie zaobserwowano zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.

Rola w patogenezie

Białka związane z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi mogą wpływać pro- lub przeciwzapalnie w układzie odpornościowym gospodarza. P. gingivalis preferencyjnie upakowuje do pecherzyków zewnatrzbłonowych białka nazywane gingipainami, które należą do proteaz i stanowią jego główne czynniki wirulencji [37]. Gingipainy degradują cytokiny w celu osłabienia stanu zapalnego u gospodarza i jego odpowiedzi immunologicznej. Odwrotne działanie wykazują pęcherzyki zewnątrzbłonowe uwalniane przez Campylobacter jejuni, które nasilają odpowiedź odpornościową przez eksport szesnastu immunogennych glikoprotein [28]. Pęcherzyki enterotoksycznych szczepów E. coli (ETEC, enterotoxigenic E. coli) zawierają znaczne ilości aktywnej fizjologicznie toksyny termolabilnej (LT, heat--labile toxin) [41]. Doniesienia wskazują, że rozpuszczalna LT pochodzaca z peryplazmy szczepów ETEC wywołuje podobną odpowiedź cytokinową jak toksyna LT, która jest związana z pęcherzykami zewnątrzbłonowymi, jednak proces ten zachodzi w wyniku innej aktywacji [19]. Porównanie między dwoma sposobami eksportu wykazuje różnice kinetyczne w aktywacji czynnika transkrypcji CREB (CREB--cAMP response element-binding protein). Dzieje się tak prawdopodobnie ze względu na różnice w sposobie prezentacji toksyn przez komórki. Natomiast komórki makrofagów wykrywają zarówno lipidowe, jak i białkowe składniki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych P. aeruginosa, co prowadzi do swoistej dla danego szczepu odpowiedzi odpornościowej [13, 27].

Wpływ na układ odpornościowy

Pęcherzyki zewnątrzbłonowe wydzielane przez bakterie po zakażeniu, wchodzą w interakcje z komórkami układu odpornościowego, w tym związanymi z odpornością wrodzoną. Badania wykazały, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe *Neisseria meningitidis* mogą stymulować neutrofile, powodując wytwarzanie TNF- α i IL-1 β oraz nadmierne wytwarzanie CXCL8, CCL3 i CCL4 [61]. Pęcherzyki zewnątrzbłonowe wydzielane przez *Legionella pneumophila* aktywują zaś wytwarzanie cytokin prozapalnych przez

makrofagi [42, 43], a białka zawarte w mikropecherzykach H. pylori wykazują zdolność indukowania degranulacji ludzkich eozynofili [55]. Komórki prezentujące antygen, które stanowią główne połączenie odporności wrodzonej i nabytej mogą być aktywowane przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Przykładowo pęcherzyki zewnątrzbłonowe wytwarzane przez Salmonella spp. indukowały ekspresję cząsteczek kostymulujących CD86 i MHC klasy II na komórkach dendrytycznych oraz wytwarzanie TNF- α i IL-12, a także promowały rozwój odpowiedzi limfocytów T oraz B [3]. Podobna zależność występowała w przypadku pecherzyków zewnatrzbłonowych uwalnianych przez E. coli; następował zwiększony wychwyt przez komórki dendrytyczne, wytwarzanie IL-6, IL-1β oraz indukcja przeciwciał in vivo [52]. Oddziaływania te zachodzą również z innymi komórkami gospodarza, w tym z komórkami śródbłonka i płytkami krwi. Pęcherzyki zewnątrzbłonowe E. coli powodują zwiększenie syntezy transbłonowego białka ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), selektyny E i cząsteczki adhezji śródbłonka naczyniowego (VCAM-1), a także wzmacniają wiązanie leukocytów z ludzkimi mikronaczyniowymi komórkami śródbłonka [50]. Dzięki tak silnej stymulacji, zarówno wrodzonej jak i nabytej odporności bakteryjne pecherzyki zewnatrzkomórkowe wydaja sie odpowiednimi kandydatami do wykorzystania w projektowaniu szczepionek przeciwbakteryjnych [115].

Korzystne interakcje z komórkami gospodarza

Wykazano, że pęcherzyki zewnątrzbłonowe wydzielane przez probiotyczny szczep E. coli Nissle chronia przed biegunkami [5]. Probiotyczne szczepy Lactobacillus poprzez mikropęcherzyki stymulują komórki dendrytyczne, modulują wytwarzanie cytokin i stymulują wytwarzanie przeciwciał klasy IgA, co wpływa korzystnie na mikrobiotę jelit. Ponadto pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą przenikać przez barierę nabłonkową jelit i migrować do innych narządów lub wchodzić w interakcje z układem odpornościowym gospodarza [10, 51]. Bakterie probiotyczne z powodu immunomodulującego wpływu na układ odpornościowy i bezpieczeństwo stosowania są dobrymi kandydatami do zwiększania tolerancji na alergeny. Wykazano, że komórki dendrytyczne stymulowane pęcherzykami błonowymi wydzielanymi przez Bifidobacterium bifidum indukowały tworzenie komórek T regulatorowych z naiwnych komórek T. Wyniki te wskazują na potencjalne zastosowanie tych nanostruktur w swoistej alergenowi immunoterapii [70]. Wykazano również właściwości przeciwnowotworowe bakteryjnych pecherzyków zewnątrzkomórkowych, m.in. mikropęcherzyki wydzielane przez L. rhamnosus działały cytotoksycznie na komórki nowotworowe wątroby [10].

BIOMEDYCZNE ZASTOSOWANIA BAKTERYJNYCH PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Projektowanie szczepionek

Pęcherzyki zewnątrzbłonowe biorą udział w transporcie toksyn oraz czynników wirulencji wytwarzanych przez bakterie do komórek gospodarza, co wywołuje indukcję odpowiedzi odpornościowej. Dzięki takim właściwościom pęcherzyki mogłyby zostać wykorzystane do swoistego "trenowania" układu odpornościowego w celu sprawnego rozpoznania i zwalczania patogenów. Poza tym, dzięki silnej stymulacji zarówno wrodzonej jak i nabytej odporności, bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydają się odpowiednimi kandydatami do wykorzystania w projektowaniu szczepionek przeciwko infekcjom [115].

W technologii wytwarzania szczepionek istotna rolę pełnia adiuwanty. Są stosowane powszechnie w celu zwiększenia odpowiedzi immunologicznej. Inaktywowane antygeny szczepionkowe bez adiuwanta na ogół nie wywołują wystarczającego zwiększenia i wydłużenia czasu utrzymywania się odpowiedzi humoralnej związanej z wytworzeniem swoistych przeciwciał. Obecność adiuwantów pozwala na zmniejszenie ilości podawanego antygenu w pojedynczej dawce, a także zmniejszenie liczby dawek przypadających na dany schemat szczepienia [32]. Podejmowane są próby wykorzystywania pęcherzyków jako adiuwantów w konstruowaniu szczepionek, przede wszystkim pochodzących z pecherzyków zewnątrzbłonowych E. coli. Jednym z przykładów może być kowalencyjne połączenie tych pęcherzyków z antygenami malarii w celu pozyskania nowej szczepionki donosowej. Wyniki potwierdziły, że istnieje możliwość wykorzystania pęcherzyków jako adiuwantów, o porównywalnej aktywności z adiuwantem toksyny cholery [85]. Ponadto, pęcherzyki mogą być połączone nie tylko z białkami; badania wykazują, że pęcherzyki wydzielane przez N. meningitidis można łączyć z lipopolisacharydami Shigella, aby uzyskać odporność na zapalenie rogówki i spojówki o tej etiologii [78].

Potencjał bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych potwierdzono w zaawansowanych fazach badań klinicznych nad szczepionką przeciw meningokokom grupy B-4CMenB (four-component meningococcal group B). Szczepionka ta zawiera trzy rekombinowane białka powierzchniowe: białko fuzyjne NHBA (antygen Neisse*ria* wiążący heparynę), fHbp (białko wiążące czynnik H) oraz białko NadA i pęcherzyki błony zewnętrznej szczepu N. meningitidis New Zeland (NZ OMV) [40]. Warto wspomnieć, że szczepionkę na bazie NZ OMV stosowano skutecznie w Nowej Zelandii w latach 2004-2008 w celu ograniczenia panującej tam epidemii. Preparat 4CMenB, został po raz pierwszy dopuszczony do obrotu w Europie w 2013 r. oraz w Stanach Zjednoczonych w 2015 r, w krajach europejskich do stosowania u niemowląt od 2 miesiąca życia. Preparaty zawierające pęcherzyki zewnątrzbłonowe N. meningitidis grupy B charakteryzowały się efektywnością w zakresie 83-85%, co czyni 4CMenB istotnym narzędziem zapobiegania infekcjom o tej etiologii, a także jest potwierdzeniem dużego potencjału bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w wakcynologii [115].

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako nośniki substancji terapeutycznych

Badania nad skutecznymi nośnikami leków, mającymi zadowalającą biodostępność przy jednoczesnym wysokim

indeksie terapeutycznym, to jeden z istotniejszych kierunków rozwoju technologii postaci środków leczniczych. Funkcję nośników leków mogą z powodzeniem pełnić zróżnicowane nanomateriały, w tym polimery, liposomy oraz materiały węglowe. Chcąc osiągnąć założenia terapii celowanej, uzyskując jednocześnie kontrolowane dostarczanie leku, niezbędne jest pozyskanie nośnika wykazującego pożądane właściwości. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, ze względu na niewielkie wymiary i biokompatybilność ich dwuwarstwy lipidowej z błonami komórkowymi są obiecującymi kandydatami na nośniki leków. W badaniach z wykorzystaniem szczepu E. coli zmodyfikowanego metodami inżynierii genetycznej pozyskano pęcherzyki zewnątrzbłonowe zawierające na powierzchni kompleks cząsteczek "anti-HER2 affibody" z cytolizyną A [22, 34]. Pęcherzyki te były "ukierunkowane" na komórki nowotworowe wykazujące ekspresję receptora HER-2. Do wnętrza pęcherzyków metodą elektroporacji wprowadzono cząsteczki siRNA (small interfering RNA, mały interferujący RNA), którego celem molekularnym jest mRNA białka KSP (kinesin spindle protein). Taki konstrukt po osiągnięciu celu uwalnia zawartość do wnętrza komórki wywołując efekt cytotoksyczny. Pomimo niedużej wydajności "ładowania", zawartość siRNA w zmodyfikowanych pecherzykach była wystarczająca do osiągniecia działania cytotoksycznego na komórki HER2-dodatnie. Było to możliwe dzięki selektywnej kumulacji pęcherzyków po podaniu w miejscu guza. Powstałe dzięki metodom inżynierii pęcherzyki zewnątrzbłonowe cechowały się niską toksycznością oraz dużą skutecznością, co czyni je obiecującymi kandydatami do wykorzystania jako nośniki leków [115].

Innym istotnym zastosowaniem bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w lecznictwie może być transport enzymów. Dotychczas, ze względu na degradację enzymów terapeutycznych w surowicy, osiągnięcie przez nie celu biologicznego było znacznie utrudnione. "Upakowanie" w świetle pęcherzyków mogłoby się przyczynić do poprawy ich stabilności, a przez to zwiększenia skuteczności terapii. W badaniach przeprowadzonych przez grupę naukowców ze Stanów Zjednoczonych fosfotriesteraza wyizolowana z *Brevundimonas diminuta* zawierająca dwujądrowe miejsce aktywne Zn/Zn była selektywnie upakowywana w pęcherzyki zewnątrzbłonowe, natomiast w celu właściwego zakotwiczenia enzymu wykorzystano białko OmpA. Wykazano, że fosfotriesteraza związana w pęcherzykach charakteryzowała się kinetyką zbliżoną do natywnego enzymu i nie wykazywała zmiany aktywności enzymatycznej [6, 8].

PODSUMOWANIE

Bakteryjne pęcherzyki zewnatrzkomórkowe ciesza sie dużym zainteresowaniem świata nauki ze względu na ich potencjalne wykorzystanie w wakcynologii i terapii celowanej. Ostatnio powstało nawet specjalistyczne czasopismo przeznaczone badaniom pęcherzyków zewnątrzkomórkowych - Journal of Extracellular Vesicles, odbywają się również regularne konferencje międzynarodowe poświęcone tej tematyce. Mechanizmy regulacji biogenezy tych nanostruktur oraz sam proces nadal pozostają nie do końca wyjaśnione i wymagają dalszych badań, zwłaszcza u bakterii Gram-dodatnich oraz mykobakterii. Nowoczesne techniki bazujące na spektrometrii mas, ultra- i wysokosprawnej chromatografij cieczowej oraz metody biologii molekularnej i sekwencjonowania NGS stanowią ważne narzędzia dające możliwość charakteryzowania profilu lipidowego, białkowego oraz zawartości kwasów nukleinowych w bakteryjnych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych. Jest to niezbędne do określenia ich potencjalnej przydatności terapeutycznej. Liczne badania naukowe koncentrują się na projektowaniu zawartości molekularnej pęcherzyków zarówno w ich wnętrzu, jak i na powierzchni, dzięki czemu mogą stać się w przyszłości istotną gałęzią farmakologii. Współczesne techniki inżynierii genetycznej pozwalają na programowanie komórek bakteryjnych, w celu zamieniania ich w prężne mikrofabryki pęcherzyków o pożądanym składzie, co sprawi, że będą bardzo użyteczne w różnych sektorach przemysłu biotechnologicznego.

PIŚMIENNICTWO

[1] Agrawal A., Ramachandran R.: Exploring the links between lipid geometry and mitochondrial fission: Emerging concepts. Mitochondrion, 2019; 49: 305–313

[2] Ahmadi Badi S., Bruno S.P., Moshiri A., Tarashi S., Siadat S.D., Masotti A.: Small RNAs in outer membrane vesicles and their function in host-microbe interactions. Front. Microbiol., 2020; 11: 1209

[3] Alaniz R.C., Deatherage B.L., Lara J.C., Cookson B.T.: Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. J. Immunol., 2007; 179: 7692–7701

[4] Allesen-Holm M., Barken K.B., Yang L., Klausen M., Webb J.S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T.: A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms. Mol. Microbiol., 2006; 59: 1114–1128 [5] Alvarez C.S., Badia J., Bosch M., Giménez R., Baldomà L.: Outer membrane vesicles and soluble factors released by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and commensal ECOR63 enhance barrier function by regulating expression of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. Front. Microbiol., 2016; 7: 1981

[6] Alves N.J., Turner K.B., Daniele M.A., Oh E., Medintz I.L., Walper S.A.: Bacterial nanobioreactors-directing enzyme packaging into bacterial outer membrane vesicles. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2015; 7: 24963–24972

[7] Alves N.J., Turner K.B., DiVito K.A., Daniele M.A., Walper S.A.: Affinity purification of bacterial outer membrane vesicles (OMVs) utilizing a His-tag mutant. Res. Microbiol., 2017; 168: 139–146

[8] Alves N.J., Turner K.B., Medintz I.L., Walper S.A.: Protecting enzymatic function through directed packaging into bacterial outer membrane vesicles. Sci. Rep., 2016; 6: 24866 [9] Araiza-Villanueva M., Avila-Calderón E.D., Flores-Romo L., Calderón-Amador J., Sriranganathan N., Qublan H.A., Witonsky S., Aguilera-Arreola M.G., Ruiz-Palma M.D., Ruiz E.A., Suárez-Güemes F., Gómez-Lunar Z., Contreras-Rodríguez A.: Proteomic analysis of membrane blebs of *Brucella abortus* 2308 and RB51 and their evaluation as an acellular vaccine. Front. Microbiol., 2019; 10: 2714

[10] Behzadi E., Mahmoodzadeh Hosseini H., Imani Fooladi A.A.: The inhibitory impacts of *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived extracellular vesicles on the growth of hepatic cancer cells. Microb. Pathog., 2017; 110: 1–6

[11] Berleman J.E., Allen S., Danielewicz M.A., Remis J.P., Gorur A., Cunha J., Hadi M.Z., Zusman D.R., Northen T.R., Witkowska H.E., Auer M.: The lethal cargo of *Myxococcus xanthus* outer membrane vesicles. Front. Microbiol., 2014; 5: 474

[12] Bitto N.J., Chapman R., Pidot S., Costin A., Lo C., Choi J., D'Cruze T., Reynolds E.C., Dashper S.G., Turnbull L., Whitchurch C.B., Stinear T.P., Stacey K.J., Ferrero R.L.: Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. Sci. Rep., 2017; 7: 7072

[13] Bonnington K.E., Kuehn M.J.: Protein selection and export via outer membrane vesicles. Biochim. Biophys. Acta, 2014; 1843: 1612–1619

[14] Brown L., Wolf J.M., Prados-Rosales R., Casadevall A.: Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. Nat. Rev. Microbiol., 2015; 13: 620–630

[15] Caruana J.C., Walper S.A.: Bacterial membrane vesicles as mediators of microbe – microbe and microbe – host community interactions. Front. Microbiol., 2020; 11: 432

[16] Chatterjee S.N., Das J.: Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. J. Gen. Microbiol., 1967; 49: 1–11

[17] Chatterjee S., Mondal A., Mitra S., Basu S.: Acinetobacter baumannii transfers the blaNDM-1 gene via outer membrane vesicles. J. Antimicrob. Chemother., 2017; 72: 2201–2207

[18] Choi E.J., Lee H.G., Bae I.H., Kim W., Park J., Lee T.R., Cho E.G.: *Propionibacterium acnes*-derived extracellular vesicles promote acne-like phenotypes in human epidermis. J. Invest. Dermatol. 2018; 138: 1371–1379

[19] Chutkan H., Kuehn M.J.: Context-dependent activation kinetics elicited by soluble versus outer membrane vesicle-associated heatlabile enterotoxin. Infect. Immun., 2011; 79: 3760–3769

[20] Clarke A.J.: The "hole" story of predatory outer-membrane vesicles. Can. J. Microbiol., 2018; 64: 589–599

[21] Daffé M.: The cell envelope of tubercle bacilli. Tuberculosis, 2015; 95: S155-S158

[22] Daniele L., Sapino A.: Anti-HER2 treatment and breast cancer: State of the art, recent patents, and new strategies. Recent Pat. Anticancer Drug Discov., 2009; 4: 9–18

[23] Dauros-Singorenko P., Blenkiron C., Phillips A., Swift S.: The functional RNA cargo of bacterial membrane vesicles. FEMS Microbiol. Lett., 2018; 365: fny023

[24] Dean S.N., Rimmer M.A., Turner K.B., Phillips D.A., Caruana J.C., Hervey W.J.4th, Leary D.H., Walper S.A.: *Lactobacillus acidophilus* membrane vesicles as a vehicle of bacteriocin delivery. Front. Microbiol., 2020; 11: 710

[25] Devos S., Van Putte W., Vitse J., Van Driessche G., Stremersch S., Van Den Broek W., Raemdonck K., Braeckmans K., Stahlberg H., Kudryashev M., Savvides S.N., Devreese B.: Membrane vesicle secretion and prophage induction in multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in response to ciprofloxacin stress. Environ. Microbiol., 2017; 19: 3930–3937

[26] Elhenawy W., Debelyy M.O., Feldman M.F.: Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into *Bacteroides* outer membrane vesicles. mBio, 2014; 5: e00909–14

[27] Ellis T.N., Leiman S.A., Kuehn M.J.: Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components. Infect. Immun., 2010; 78: 3822–3831

[28] Elmi A., Watson E., Sandu P., Gundogdu O., Mills D.C., Inglis N.F., Manson E., Imrie L., Bajaj-Elliott M., Wren B.W., Smith D.G., Dorrell N.: *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles play an important role in bacterial interactions with human intestinal epithelial cells. Infect. Immun., 2012; 80: 4089–4098

[29] Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S.: Biofilms: An emergent form of bacterial life. Nat. Rev. Microbiol., 2016; 14: 563–575

[30] Gao W., Fang R.H., Thamphiwatana S., Luk B.T., Li J., Angsantikul P., Zhang Q., Hu C.M., Zhang L.: Modulating antibacterial immunity via bacterial membrane-coated nanoparticles. Nano Lett., 2015; 15: 1403–1409

[31] Gatkowska J., Długońska H.: Rola zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych w interakcji pasożyt-żywiciel. Postępy Hig. Med. Dośw., 2016; 70: 951–958

[32] Gołoś A., Lutyńska A.: Adiuwanty glinowe w szczepionkach – aktualny stan wiedzy. Przegl. Epidemiol., 2015; 69: 871–874

[33] Grande R., Celia C., Mincione G., Stringaro A., Di Marzio L., Colone M., Di Marcantonio M.C., Savino L., Puca V., Santoliquido R., Locatelli M., Muraro R., Hall-Stoodley L., Stoodley P.: Detection and physicochemical characterization of membrane vesicles (MVs) of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. Front. Microbiol., 2017; 8: 1040

[34] Gujrati V., Kim S., Kim S.H., Min J.J., Choy H.E., Kim S.C., Jon S.: Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy. ACS Nano, 2014; 8: 1525–1537

[35] Gupta S., Rodriguez G.M.: Mycobacterial extracellular vesicles and host pathogen interactions. Pathog. Dis., 2018; 76: fty031

[36] Hashimoto M., Matsumoto T., Tamura-Nakano M., Ozono M., Hashiguchi S., Suda Y.: Characterization of outer membrane vesicles of *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283. J. Biosci. Bioeng., 2018; 125: 425–431

[37] Haurat M.F., Aduse-Opoku J., Rangarajan M., Dorobantu L., Gray M.R., Curtis M.A., Feldman M.F.: Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. J. Biol. Chem., 2011; 286: 1269–1276

[38] Haurat M.F., Elhenawy W., Feldman M.F.: Prokaryotic membrane vesicles: New insights on biogenesis and biological roles. Biol. Chem., 2015; 396: 95–109

[39] Hoekstra D., van der Laan J.W., de Leij L., Witholt B.: Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, 1976; 455: 889–899

[40] Holst J., Oster P., Arnold R., Tatley M.V., Næss L.M., Aaberge I.S., Galloway Y., McNicholas A., O'Hallahan J., Rosenqvist E., Black S.: Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): Lessons from past programs and implications for the future. Hum. Vaccin. Immunother, 2013; 9: 1241–1253

[41] Horstman A.L., Bauman S.J., Kuehn M.J.: Lipopolysaccharide 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) core determines bacterial association of secreted toxins. J. Biol. Chem., 2004; 279: 8070–8075

[42] Jäger J., Marwitz S., Tiefenau J., Rasch J., Shevchuk O., Kugler C., Goldmann T., Steinert M.: Human lung tissue explants reveal novel interactions during *Legionella pneumophila* infections. Infect. Immun., 2013; 82: 275–285

[43] Jeon J., Park S.C., Her J., Lee J.W., Han J.K., Kim Y.K., Kim K.P., Ban C.: Comparative lipidomic profiling of the human commensal bacterium *Propionibacterium acnes* and its extracellular vesicles. RSC Adv., 2018; 8: 15241–15247

[44] Jiang Y., Kong Q., Roland K.L., Curtiss R.3rd: Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. Int. J. Med. Microbiol., 2014; 304: 431–443

[45] Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J.: Virulence factors are released from Pseudomonas aeruginosa in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: A novel mechanism of enzyme secretion. J. Bacteriol., 1995; 177: 3998–4008

[46] Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J.: Bacteriolytic effect of membrane vesicles from Pseudomonas aeruginosa on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. J. Bacteriol., 1996; 178: 2767–2774

[47] Kadurugamuwa J.L., Mayer A., Messner P., Sára M., Sleytr U.B., Beveridge T.J.: S-layered *Aneurinibacillus* and Bacillus spp. are susceptible to the lytic action of Pseudomonas aeruginosa membrane vesicles. J. Bacteriol., 1998; 180: 2306–2311

[48] Kamaguchi A., Nakayama K., Ichiyama S., Nakamura R., Watanabe T., Ohta M., Baba H., Ohyama T.: Effect of *Porphyromonas gingivalis* vesicles on coaggregation of *Staphylococcus aureus* to oral microorganisms. Curr. Microbiol., 2003; 47: 485–491

[49] Kesty N.C., Kuehn M.J.: Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. J. Biol. Chem., 2004; 279: 2069–2076

[50] Kim J.H., Jeun E.J., Hong C.P., Kim S.H., Jang M.S., Lee E.J., Moon S.J., Yun C.H., Im S.H., Jeong S.G., Park B.Y., Kim K.T., Seoh J.Y., Kim Y.K., Oh S.J., i wsp.: Extracellular vesicle-derived protein from *Biffidobacterium longum* alleviates food allergy through mast cell suppression. J. Allergy Clin. Immunol., 2016; 137: 507–516

[51] Kim J.H., Yoon Y.J., Lee J., Choi E.J., Yi N., Park K.S., Park J., Lötvall J., Kim Y.K., Gho Y.S.: Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* up-regulate expression of endothelial cell adhesion molecules in vitro and in vivo. PLoS One, 2013; 8: e59276

[52] Kim O.Y., Hong B.S., Park K.S., Yoon Y.J., Choi S.J., Lee W.H., Roh T.Y., Lötvall J., Kim Y.K., Gho Y.S.: Immunization with *Escherichia coli* outer membrane vesicles protects bacteria induced lethality via Th1 and Th17 cell responses. J. Immunol., 2013; 190: 4092–4102

[53] Kim O.Y., Park H.T., Dinh N.T.H., Choi S.J., Lee J., Kim J.H., Lee S.W., Gho Y.S.: Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response. Nat. Commun., 2017; 8: 626

[54] Knox K.W., Vesk M., Work E.: Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysinelimited culture of Escherichia coli. J. Bacteriol., 1966; 92: 1206–1217 [55] Ko S.H., Jeon J.I., Kim Y.J., Yoon H.J., Kim H., Kim N., Kim J.S., Kim J.M.: Helicobacter pylori outer membrane vesicle proteins induce human eosinophil degranulation via a $\beta 2$ integrin CD11/CD18- and ICAM-1-dependent mechanism. Mediators Inflammation, 2015; 2015: 301716

[56] Kulkarni H.M., Jagannadham M.V.: Biogenesis and multifaceted <u>roles of outer m</u>embrane vesicles from Gram-negative bacteria. Microbiology, 2014; 160: 2109–2121

[57] Kulkarni H.M., Swamy C.V., Jagannadham M.V.: Molecular characterization and functional analysis of outer membrane vesicles from the antarctic bacterium Pseudomonas syringae suggest a possible response to environmental conditions. J. Proteome Res., 2014; 13: 1345–1358

[58] Kulp A., Kuehn M.J.: Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. Annu. Rev. Microbiol., 2010; 64: 163–184

[59] Kurthkoti K., Amin H., Marakalala M.J., Ghanny S., Subbian S., Sakatos A., Livny J., Fortune S.M., Berney M., Rodriguez G.M.: The capacity of *Mycobacterium tuberculosis* to survive iron starvation might enable it to persist in iron-deprived microenvironments of human granulomas. mBio, 2017; 8: e01092–17

[60] Langlete P., Krabberød A.K., Winther-Larsen H.C.: Vesicles from *Vibrio cholerae* contain AT-Rich DNA and shorter mRNAs that do not correlate with their protein products. Front. Microbiol., 2019; 10: 2708

[61] Lapinet J.A., Scapini P., Calzetti F., Pérez O., Cassatella M.A.: Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-8, macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. Infect. Immun., 2000; 68: 6917–6923

[62] Lee E.Y., Choi D.Y., Kim D.K., Kim J.W., Park J.O., Kim S., Kim S.H., Desiderio D.M., Kim Y.K., Kim K.P., Gho Y.S.: Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles. Proteomics, 2009; 9: 5425–5436

[63] Lee J.H., Choi C.W., Lee T., Kim S.I., Lee J.C., Shin J.H.: Transcription factor σB plays an important role in the production of extracellular membrane-derived vesicles in Listeria monocytogenes. PLoS One, 2013; 8: e73196

[64] Lekmeechai S., Su Y.C., Brant M., Alvarado-Kristensson M., Vallström A., Obi I., Arnqvist A., Riesbeck K.: *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles protect the pathogen from reactive oxygen species of the respiratory burst. Front. Microbiol., 2018; 9: 1837

[65] Li M., Zhou H., Yang C., Wu Y., Zhou X., Liu H., Wang Y.: Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update. J. Controlled Release, 2020; 323: 253–268

[66] Li Z., Clarke A.J., Beveridge T.J.: A major autolysin of Pseudomonas aeruginosa: Subcellular distribution, potential role in cell growth and division and secretion in surface membrane vesicles. J. Bacteriol., 1996; 178: 2479–2488

[67] Li Z., Clarke A.J., Beveridge T.J.: Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. J. Bacteriol., 1998; 180: 5478–5483

[68] Liao S., Klein M.I., Heim K.P., Fan Y., Bitoun J.P., Ahn S.J., Burne R.A., Koo H., Brady L.J., Wen Z.T.: *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. J. Bacteriol., 2014; 196: 2355-2366

[69] Liao Y.T., Kuo S.C., Chiang M.H., Lee Y.T., Sung W.C., Chen Y.H., Chen T.L., Fung C.P.: *Acinetobacter baumannii* extracellular OXA-58 is primarily and selectively released via outer membrane vesicles after sec-dependent periplasmic translocation. Antimicrob. Agents Chemother., 2015; 59: 7346–7354

[70] López P., González-Rodríguez I., Sánchez B., Gueimonde M., Margolles A., Suárez A.: Treg-inducing membrane vesicles from *Bifidobacterium bifidum* LMG13195 as potential adjuvants in immunotherapy. Vaccine, 2012; 30: 825–829

[71] Mashburn L.M., Whiteley M.: Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. Nature, 2005; 437: 422-425

[72] McBroom A.J., Johnson A.P., Vemulapalli S., Kuehn M.J.: Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. J. Bacteriol., 2006; 188: 5385–5392

[73] Mergenhagen S.E., Bladen H.A., Hsu K.C.: Electron microscopic localization of endotoxic lipopolysaccharide in Gramnegative organisms. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1966; 133: 279–291

[74] Mug-Opstelten D., Witholt B.: Preferential release of new outer membrane fragments by exponentially growing Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta, 1978; 508: 287–295

[75] Nagakubo T., Nomura N., Toyofuku M.: Cracking open bacterial membrane vesicles. Front. Microbiol., 2020; 10: 3026

[76] Olaya-Abril A., Prados-Rosales R., McConnell M.J., Martín-Peña R., González-Reyes J.A., Jiménez-Munguía I., Gómez-Gascón L., Fernández J., Luque-García J.L., García-Lidón C., Estévez H., Pachón J., Obando I., Casadevall A., Pirofski L.A. i wsp.: Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. J. Proteomics, 2014; 106: 46–60

[77] Oliver C., Hernández M.A., Tandberg J.I., Valenzuela K.N., Lagos L.X., Haro R.E., Sánchez P., Ruiz P.A., Sanhueza-Oyarzún C., Cortés M.A., Villar M.T., Artigues A., Winther-Larsen H.C., Avendaño-Herrera R., Yáñez A.J.: The proteome of biologically active membrane vesicles from *Piscirickettsia salmonis* LF-89 type strain identifies plasmid-encoded putative toxins. Front. Cell. Infect. Microbiol., 2017; 7: 420

[78] Orr N., Robin G., Cohen D., Arnon R., Lowell G.H.: Immunogenicity and efficacy of oral or intranasal *Shigella flexneri* 2a and *Shigella sonnei* proteosome-lipopolysaccharide vaccines in animal models. Infect. Immun., 1993; 61: 2390–2395

[79] Palsdottir H., Remis J.P., Schaudinn C., O'Toole E., Lux R., Shi W., McDonald K.L., Costerton J.W., Auer M.: Three-dimensional macromolecular organization of cryofixed *Myxococcus xanthus* biofilms as revealed by electron microscopic tomography. J. Bacteriol., 2009; 191: 2077–2082

[80] Parida S.K., Domann E., Rohde M., Müller S., Darji A., Hain T., Wehland J., Chakraborty T.: Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of Listeria monocytogenes into human endothelial cells. Mol. Microbiol., 2002; 28: 81–93

[81] Park J.S., Lee W.C., Yeo K.J., Ryu K.S., Kumarasiri M., Hesek D., Lee M., Mobashery S., Song J.H., Kim S.I., Lee J.C., Cheong C., Jeon Y.H., Kim H.Y.: Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane. FASEB J., 2012; 26: 219–228

[82] Pérez-Cruz C., Carrión O., Delgado L., Martinez 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 [83] Prados-Rosales R., Baena A., Martinez L.R., Luque-Garcia J., Kalscheuer R., Veeraraghavan U., Camara C., Nosanchuk J.D., Besra G.S., Chen B., Jimenez J., Glatman-Freedman A., Jacobs W.R.Jr., Porcelli S.A., Casadevall A.: Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2dependent manner in mice. J. Clin. Invest., 2011; 121: 1471–1483

[84] Prados-Rosales R., Weinrick B.C., Piqué D.G., Jacobs W.R. Jr., Casadevall A., Rodriguez G.M.: Role for *Mycobacterium tuberculosis* membrane vesicles in iron acquisition. J. Bacteriol., 2014; 196: 1250–1256

[85] Pritsch M., Ben-Khaled N., Chaloupka M., Kobold S., Berens-Riha N., Peter A., Liegl G., Schubert S., Hoelscher M., Löscher T., Wieser A.: Comparison of intranasal outer membrane vesicles with Cholera toxin and injected MF59C.1 as adjuvants for malaria transmission blocking antigens AnAPN1 and Pfs48/45. J. Immunol. Res., 2016; 2016: 3576028

[86] Rakoff-Nahoum S., Coyne M.J., Comstock L.E.: An ecological network of polysaccharide utilization among human intestinal symbionts. Curr. Biol., 2014; 24: 40–49

[87] Rao P.K., Rodriguez G.M., Smith I., Li Q.: Protein dynamics in iron-starved *Mycobacterium tuberculosis* revealed by turnover and abundance measurement using hybrid-linear ion trap-Fourier transform mass spectrometry. Anal. Chem., 2008; 80: 6860–6869

[88] Rath P., Huang C., Wang T., Wang T., Li H., Prados-Rosales R., Elemento O., Casadevall A., Nathan C.F.: Genetic regulation of vesiculogenesis and immunomodulation in *Mycobacterium tuber-culosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013; 110: 4790–4797

[89] Ratledge C., Patel P.V., Mundy J.: Iron transport in *Mycobacterium smegmatis*: The location of mycobactin by electron microscopy. J. Gen. Microbiol., 1982; 128: 1559–1565

[90] Renelli M., Matias V., Lo R.Y., Beveridge T.J.: DNA-containing membrane vesicles of Pseudomonas aeruginosa PAO1 and their genetic transformation potential. Microbiology, 2004; 150: 2161–2169

[91] Resch U., Tsatsaronis J.A., Le Rhun A., Stübiger G., Rohde M., Kasvandik S., Holzmeister S., Tinnefeld P., Wai S.N., Charpentier E.: A two-component regulatory system impacts extracellular membrane-derived vesicle production in group A Streptococcus. mBio, 2016; 7: e00207–16

[92] Rivera J., Cordero R.J., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A.: Bacillus anthracis produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010; 107: 19002–19007

[93] Rodriguez G.M., Prados-Rosales R.: Functions and importance of mycobacterial extracellular vesicles. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2016; 100: 3887–3892

[94] Rodriguez G.M., Smith I.: Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: Role in physiology and virulence. Mol. Microbiol., 2003; 47: 1485–1494

[95] Roier S., Zingl F.G., Cakar F., Durakovic S., Kohl P., Eichmann T.O., Klug L., Gadermaier B., Weinzerl K., Prassl R., Lass A., Daum G., Reidl J., Feldman M.F., Schild S.: A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. Nat. Commun., 2016; 7: 10515

[96] Rothfield L., Pearlman-Kothencz M.: Synthesis and assembly of bacterial membrane components: A lipopolysaccharidephospholipid-protein complex excreted by living bacteria. J. Mol. Biol., 1969; 44: 477–492 [97] Rumbo C., Fernández-Moreira E., Merino M., Poza M., Mendez J.A., Soares N.C., Mosquera A., Chaves F., Bou G.: 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., 2011; 55: 3084–3090

[98] Sander L.E., Davis M.J., Boekschoten M.V., Amsen D., Dascher C.C., Ryffel B., Swanson J.A., Müller M., Blander J.M.: Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. Nature, 2011; 474: 385–389

[99] Schooling S.R., Beveridge T.J.: Membrane vesicles: An overlooked component of the matrices of biofilms. J. Bacteriol., 2006; 188: 5945–5957

[100] Schrempf H., Koebsch I., Walter S., Engelhardt H., Meschke H.: Extracellular *Streptomyces* vesicles: Amphorae for survival and defence. Microb. Biotechnol., 2011; 4: 286–299

[101] Seitz P., Pezeshgi Modarres H., Borgeaud S., Bulushev R.D., Steinbock L.J., Radenovic A., Dal Peraro M., Blokesch M.: ComEA is essential for the transfer of external DNA into the periplasm in naturally transformable *Vibrio cholerae* cells. PLoS Genet., 2014; 10: e1004066

[102] Singh U., Grenier D., McBride B.C.: *Bactemides gingivalis* vesicles mediate attachment of streptococci to serum-coated hydroxyapatite. Oral Microbiol. Immunol., 1989; 4: 199–203

[103] Smith S.G., Mahon V., Lambert M.A., Fagan R.P.: A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. FEMS Microbiol. Lett., 2007; 273: 1–11

[104] Solanki K.S., Pal D., Kaur G., Kumar P., Sahoo M., Chaudhuri P.: Isolation and characterization of OMPs and OMVs of *Brucella abortus* S19 and *Brucella abortus* S19∆per. J. Pure Appl. Microbiol., 2016; 10: 2121–2126

[105] Tashiro Y., Inagaki A., Shimizu M., Ichikawa S., Takaya N., Nakajima-Kambe T., Uchiyama H., Nomura N.: Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2011; 75: 605–607

[106] Tashiro Y., Yawata Y., Toyofuku M., Uchiyama H., Nomura N.: Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. Microbes Environ., 2013; 28: 13–24

[107] Todorova D., Simoncini S., Lacroix R., Sabatier F., Dignat-George F.: Extracellular vesicles in angiogenesis. Circ. Res., 2017; 120: 1658–1673 [108] Toyofuku M., Cárcamo-Oyarce G., Yamamoto T., Eisenstein F., Hsiao C.C., Kurosawa M., Gademann K., Pilhofer M., Nomura N., Eberl L.: Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in Bacillus subtilis. Nat. Commun., 2017; 8: 481

[109] Toyofuku M., Nomura N., Eberl L.: Types and origins of bacterial membrane vesicles. Nat. Rev. Microbiol., 2019; 17: 13–24

[110] Toyofuku M., Tashiro Y., Nomura N., Eberl L.: Functions of MVs in Inter-Bacterial Communication. W: Bacterial Membrane Vesicles. Biogenesis, Function and Applications, red.: M. Kapara-kis-Liaskos, T.A. Kufer, Springer, Cham, Szwajcaria 2020, 101-117

[111] Tsatsaronis J.A., Franch-Arroyo S., Resch U., Charpentier E.: Extracellular vesicle RNA: A universal mediator of microbial communication? Trends Microbiol., 2018; 26: 401-410

[112] Tzipilevich E., Habusha M., Ben-Yehuda S.: Acquisition of phage sensitivity by bacteria through exchange of phage receptors. Cell, 2017; 168: 186-199.e12

[113] Valguarnera E., Scott N.E., Azimzadeh P., Feldman M.F.: Surface exposure and packing of lipoproteins into outer membrane vesicles are coupled processes in Bacteroides. mSphere, 2018; 3: e00559-18

[114] Vallejo M.C., Nakayasu E.S., Longo L.V.G., Ganiko L., Lopes F.G., Matsuo A.L., Almeida I.C., Puccia R.: Correction: Lipidomic analysis of extracellular vesicles from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. PLoS One, 2012; 7: e39463

[115] Wang S., Gao J., Wang Z.: Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol., 2019; 11: e1523

[116] Yaron S., Kolling G.L., Simon L., Matthews K.R.: Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* 0157:H7 to other enteric bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 2000; 66: 4414-4420

[117] Yonezawa H., Osaki T., Kurata S., Fukuda M., Kawakami H., Ochiai K., Hanawa T., Kamiya S.: Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. BMC Microbiol., 2009; 9: 197

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.



Article Different Cutibacterium acnes Phylotypes Release Distinct Extracellular Vesicles

Anna Chudzik 🗅, Paweł Migdał and Mariola Paściak *🕩

Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, 53-114 Wroclaw, Poland; anna.chudzik@hirszfeld.pl (A.C.); pawel.migdal@hirszfeld.pl (P.M.) * Correspondence: mariola.pasciak@hirszfeld.pl

Abstract: Bacterial extracellular vesicles (EVs) perform various biological functions, including those that are critical to microbes. Determination of EVs composition allows for a deep understanding of their role in the bacterial community and communication among them. *Cutibacterium acnes*, formerly *Propionibacterium acnes*, are commensal bacteria responsible for various infections, e.g., prosthesis, sarcoidosis, soft-tissue infections, and the most known but still controversial—acnes lesion. In *C. acnes*, three major phylotypes represented variable disease associations. Herein, for the first time, we present a comparative analysis of EVs obtained from three *C. acnes* phylotypes (IA1, IB, and II) to demonstrate the existence of differences in their protein and lipid composition. In the following work, the morphological analysis of EVs was performed, and the SDS-PAGE protein profile and the lipid profile were presented using the TLC and MALDI-TOF MS methods. This study allowed us to show major differences between the protein and lipid composition of *C. acnes* EVs. This is a clear indication that EVs released by different phylotypes of the one species are not identical to each other in terms of composition and should be separately analyzed each time to obtain reliable results.

Keywords: extracellular vesicles; microvesicles; *Cutibacterium acnes*; lipid analysis; protein analysis; SDS-PAGE; TLC; MALDI-TOF MS; TEM

1. Introduction

Bacterial extracellular vesicles (EVs) have recently gained a special interest in the scientific community, both due to their therapeutic potential and participation in intercellular communication [1,2]. Secreted from the bacterial cells extracellular vesicles are spherical nanostructures with dimensions ranging from 20 to 300 nm. Formerly, they are disregarded as artifacts of bacterial growth, bubbles, or rubbish. It is now understood that EVs are purposely secreted by bacteria to aid in communication and contribute to numerous bacterial functions. Although the mechanisms controlling the release and selection of contents remain unexplained, reports indicate their important role in the bacterial community, including protective functions, support in obtaining nutrients, and horizontal gene transfer. EVs, apart from intracellular communication, take part in the pathogenesis and regulation of host immunity [3]. Due to their structure consisting of a lipid bilayer, they may contain various lipids but also numerous proteins, cellular metabolites, and nucleic acids [4]. It is the proteins and lipids that can be important elements of cell-to-cell communication via EVs. Composition analysis would improve the understanding of their function in the bacterial environment and the interaction between EVs and eukaryotic cells [5–7]. Careful elaboration of the composition will not only clarify their biological significance but also make it possible to determine their usefulness in medical applications. Outer membrane vesicles (OMVs) have been used successfully in the design of vaccines, and liposome constructs have found use as carriers for therapeutic substances [8,9]. Hence, further research into the composition, functions, and interactions in which bacterial EVs participate is necessary.



Citation: Chudzik, A.; Migdał, P.; Paściak, M. Different *Cutibacterium acnes* Phylotypes Release Distinct Extracellular Vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5797. https://doi.org/ 10.3390/ijms23105797

Academic Editor: Veronika Kralj-Iglic

Received: 31 March 2022 Accepted: 19 May 2022 Published: 21 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). *Cutibacterium acnes* (formerly *Propionibacterium acnes*) is a Gram-positive aero-tolerant anaerobic bacterium, which is a part of the human microbiota and is a major cultivable organism found on the human skin. A study of the human microbiome using DNA sequencing confirms that *Cutibacterium* belongs to abundant resident bacterial genera on the surface layers of the human skin; in human follicles, *C. acnes* is often the sole bacterial inhabitant of such areas [10]. These bacteria are successful colonizers of different human tissue sites, and such ubiquitous prevalence might indicate that the human host benefits from their presence.

Cutibacterium acnes are associated with a common skin disorder—acne vulgaris [11], but its role is controversial and has not been confirmed [12]. *C. acnes* belongs to opportunistic bacteria responsible for post-operative infections and biofilm-associated infections related to indwelling medical devices. They were isolated from prosthetic joint infections, osteomyelitis, endocarditis, endophthalmitis, and SAPHO syndrome characterized by inflammatory bone disorders [13].

Even though *C. acnes* is numerous both on the skin surface of healthy people and of those with acne vulgaris, studies have shown they differed with regard to the presence of various phylotypes [14]. There are three types within the species *C. acnes*, recently assigned to novel subspecies: I—*C. acnes* subsp. *acnes*, II—*C. acnes* subsp. *defendens* [15], III—*C. acnes* subsp. *elongatum* [16,17]. The above taxonomy is based primarily on genomic analysis and lipase activity in the individual types. Based on multilocus sequence typing, *C. acnes* strains are classified further into six main phylotypes, designated IA1, IA2, IB, IC, II, and III [17,18].

Literature data indicate that *C. acnes* phylogroups are associated with different clinical conditions [19], e.g., the type IA1 group dominated in isolates cultured from acne-affected regions, and type IB was found in isolates from soft tissue infections [19]. *C. acnes* isolated from prostatic tissues obtained after prostatectomy and positively associated with prostatic inflammation represent *C. acnes* phylotype II [20]. Comparative studies analyzing the properties of individual phylotypes within the *C. acnes* species have already been carried out [21]; however, a similar comparison regarding the EVs released by different *C. acnes* phylotypes, according to our knowledge, have not been performed yet.

EVs secreted by *C. acnes* type I were first reported in 2017 [11]. Next, Choi and collaborators found that *C. acnes* derived EVs can induce an acne-like phenotype in keratinocytes and reconstituted human skin models [22]. However, it is not known how *C. acnes* communicate with host cells after infection and neither the role of lipids present in EV in these interactions is recognized. Moreover, information concerning EVs of other representatives of *Cutibacterium* phylotypes is missing.

In this work, we intend to perform a comparative analysis of EVs obtained from three different *C. acnes* phylotypes to characterize EVs protein and lipid content and compare their morphology.

2. Results

2.1. Morphological Characteristics of Cutibacterial EVs

EVs derived from *Cutibacterium acnes* were purified from culture supernatant according to the previously established protocol for Gram-positive bacterial EVs [23] with modifications. For bacteria cultivation, we used thioglycollate-soy broth medium (TS) and anaerobic conditions.

The described method of culture allowed us to obtain satisfactory amounts of bacterial extracellular vesicles for further analysis. From 2 L of bacterial culture, 2.092 mg/mL EVs of *C. acnes* DSM 16379, 1.355 mg/mL EVs of *C. acnes* DSM 1897, and 2.994 mg/mL EVs of *C. acnes* PCM 2334 were obtained, respectively, in terms of proteins.

The homogeneity and purity of the EVs fractions were verified using transmission electron microscopy (TEM) and Dynamic Light Scattering (DLS). TEM images of the individual *Cutibacterium acnes* EVs obtained were presented in Figure 1a–c.



Figure 1. Transmission electron microscopy of *Cutibacterium acnes* EVs. (**a**) EVs isolated from *C. acnes* DSM 1897, type IA1 (**b**) EVs isolated from *C. acnes* DSM 16379, type IB (**c**) EVs isolated from *C. acnes* PCM 2334, type II. Bar 50 nm.

The mean size of the diameter of the acquired EVs for individual *C. acnes* strains determined by DLS were 93.84 nm (\pm 52.29) for DSM 1897 (Figure 2a), 83.20 nm (\pm 52.01) for DSM 16379 (Figure 2b), and 80.15 nm (\pm 35.55) for PCM 2334 (Figure 2c).



Figure 2. Cont.



Figure 2. Size distribution of *Cutibacterium acnes* EVs. (a) *C. acnes* EVs isolated from DSM 1897 type IA1, (b) EVs isolated from *C. acnes* DSM 16379 type IB, (c) EVs isolated from *C. acnes* PCM 2334 type II.

2.2. Protein Profile of C. acnes Cell Fractions and Isolated EVs

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed for the *C. acnes* cellular protein fractions and EVs fractions released by each *C. acnes* strain (Figure 3). No contaminants from the culture medium were present in the SDS-PAGE protein fractions (Figure S1). This allowed for the comparison of proteins present in EVs against cell fractions and against each phylotype.





This analysis revealed clear differences between the proteins found in EVs obtained from each *C. acnes* strain. In the case of EVs isolated from *C. acnes* type IB, only a few proteins are observed, and they can be found in each cellular fraction of *C. acnes* DSM 16379 (Figure 3b). EVs from type IA1 (DSM 1897) showed the presence of numerous vesicle proteins, and some of them were also found in the fractions of whole cell lysate, cytosolic proteins, and cell wall proteins of *C. acnes* DSM 1897 (Figure 3a). Released *C. acnes* type II EVs proteins were also found in protein fractions isolated from this strain, especially the cytosolic proteins (Figure 3c). The comparison of individual vesicle fractions allows for the demonstration of significant differences, especially in the size and abundance of the proteins. EVs released by the *C. acnes* DSM 16379 strain were characterized by the poorest protein profile—the presence of proteins in the range of about 20 kDa was found. The most abundant proteins were EVs released by the DSM 1897 strain (type IA1), with numerous proteins in the range of 15–75 kDa. Despite the fact that all phylotypes belong to the same

Size Distribution by Intensity

5 of 13

species and were processed in identical culture and isolation conditions, the protein profiles may represent differences in the adaptation of these strains to environmental conditions.

2.3. Lipid Profiles of EVs and Whole-Cell Extracts

To confirm the lipid presence in isolated EVs, lipid extracts obtained by the Bligh-Dyer method were analyzed by two-dimensional thin-layer chromatography (2D-TLC). The spots visible on the TLC plates correspond to the individual lipids present in the obtained lipid extracts (Figure 4). The differences between the lipid composition of EVs from individual strains are clearly visible. Lipid extract of EVs obtained from *C. acnes* DSM 1897 contains only six lipids (Figure 4a), while *C. acnes* PCM 2334 (Figure 4c) and DSM 16379 (Figure 4b) contain 8 and 11 lipids, respectively. The use of copper sulfate acid reagent allows for the visualization of polar lipids—both phospholipids and glycolipids. Lipids numbered 1–6 were present in extracts obtained from each phylotype. Worth mentioning are the attempts to use different reagents to visualize phospho- and glycolipids, i.e., Dittmer & Lester reagent and orcinol, respectively, were unsuccessful. In the culture medium after lipid extraction, no lipid spots were visible in 2D-TLC (Figure S2).



Figure 4. 2D-TLC lipid profiles of EVs: (**a**) *C. acnes* DSM 1897 type IA1, (**b**) *C. acnes* DSM 16379 type IB, and (**c**) *C. acnes* PCM 2334 type II. The black arrows (I and II) indicate the directions in which the chromatograms were developed. The lipids visible on the plates are numbered in the range 1–11. The TLC was developed in (I) chloroform-methanol-water (65:25:4, v/v), II chloroform-methanol-acetic acid-water (80:15:12:4, v/v), and for the detection of lipids, copper sulfate reagent and heating at 130 °C were applied.

Similar to the case of EVs lipid extracts, cellular lipid extracts differ from one another depending on the strain (Figure 5). In lipid extracts obtained from *C. acnes* DSM 1897 (Figure 5a) and PCM 2334 (Figure 5c), nine lipid compounds were present, while from *C. acnes* DSM 16379 (Figure 5b)—twelve (the most abundant lipid profile). Compared to vesicular lipid extracts, whole-cell extracts were more abundant in lipids, confirming that the selection of EVs composition is regulated by bacterial cells. These extracts differ not only in the number of lipids—the cellular lipids extract did not contain lipids number 8 and 10 in its profile but had additionally three lipids compounds (Nos. 12, 13, and 14) (Figure 5b). TLC analysis of cellular lipids of *C. acnes* strain 1897 showed the presence of nine lipids in the whole-cell extract (Figure 5a), while the vesicular extract contained six lipids (Figure 4a). These observations indicate the selectivity of the bacterial strain in terms of the selection of lipids secreted in the form of EVs.



Figure 5. 2D-TLC lipid profiles of the whole-cell extracts obtained from (**a**) *C. acnes* DSM 1897 type IA1, (**b**) *C. acnes* DSM 16379 type IB, and (**c**) *C. acnes* PCM 2334 type II. The black arrows (I and II) indicate the directions in which the chromatograms were developed. The lipids visible on the plates are numbered in the range 1–14. The TLC was developed in the solvent system (I) chloroform-methanol-water (65:25:4, v/v), then in (II) chloroform-methanol-acetic acid-water (80:15:12:4, v/v) and for the detection of lipids copper sulfate reagent and heating at 130 °C were applied.

2.4. MALDI-TOF MS Lipid Profiling

The EVs and cellular lipid extracts were also analyzed using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Figures 6 and 8). The mass spectra were acquired in the positive ion mode due to the much higher quality of the spectra than in the negative ion mode.



Figure 6. Positive ion MALDI-TOF MS spectra of EVs lipids (**a**) *C. acnes* DSM 1897 type IA1, (**b**) *C. acnes* DSM 16379 type IB, and (**c**) *C. acnes* PCM 2334 type II.

The mass peaks list generated using the FlexAnalysis software allows for a more accurate comparison of vesicle lipid profiles of different *C. acnes* phylotypes (Tables S1–S3). In all analyzed EV lipid extracts, there are five common mass peaks (739.4 m/z, 755.4 m/z, 827.4 m/z, 1341.8 m/z, 1363.8 m/z) (Figures 6 and 7, Tables S1–S3). One common mass peak (767.4 m/z) was found for the EVs from *C. acnes* DSM 16379 and 1897 strains (Figure 7). For EVs from *C. acnes* DSM 1897 and PCM 2334 strains, five common mass peaks were found (998.4 m/z, 1010.5 m/z, 1655.8 m/z, 1854.8 m/z, 2093.1 m/z), and a comparison of the EVs from *C. acnes* DSM 16379 and PCM 2334 strains led to the finding of four common mass peaks (812.3 m/z, 834.3 m/z, 1023.4 m/z, 1045.4 m/z) (Figure 7). The comparison of the

presence of mass peaks in the extracts was made after removing the peaks present in the matrix or the culture medium (Tables S7 and S8, Figure S3).

Common mass peaks in EVs lipids spectra



Figure 7. Comparison of the presence of common mass peaks of the vesicular lipids for the different *C. acnes* strains in MALDI-TOF MS analysis.

MALDI-TOF analysis of cellular lipids was performed, and again similar but distinct mass spectra of different species were obtained (Figure 8). The analysis of the peak list for individual phylotypes (Tables S4–S6) allowed us to confirm the observations previously visible in the TLC analysis: cellular lipid extracts were more abundant in lipids compared to vesicular extracts.



Figure 8. Positive ion MALDI-TOF MS spectra of whole-cell lipid extracts (**a**) *C. acnes* DSM 1897 type IA1, (**b**) *C. acnes* DSM 16379 type IB, and (**c**) *C. acnes* PCM 2334 type II.

By comparing the peak list of the EVs and whole-cell extract for the *C. acnes* PCM 2334 strain, the presence of six common mass peaks has been found (717.5 m/z, 739.4 m/z, 755.4 m/z, 827.4 m/z, 1023.5 m/z, 1363.8 m/z) (Tables S3 and S6, Figure 9). After removing from the analysis peaks from the matrix and those that were contaminants from the culture medium (Tables S7 and S8), the number of peaks in the vesicle extract was 30, while there were 76 in the whole-cell lipid extract. *C. acnes* DSM 16379 strain had 25 peaks in its vesicular extract, while the whole-cell extract had 73 peaks; fourteen common mass peaks were found

(739.4 *m*/*z*, 755.4 *m*/*z*, 767.5 *m*/*z*, 805.4 *m*/*z*, 827.3 *m*/*z*, 855.5 *m*/*z*, 871.4 *m*/*z*, 901.5 *m*/*z*, 923.5 *m*/*z*, 929.5 *m*/*z*, 951.5 *m*/*z*, 1341.8 *m*/*z*, 1363.8 *m*/*z*, 1391.9 *m*/*z*) (Tables S2 and S5, Figure 9). For the *C. acnes* DSM 1897 strain, the presence of seven common mass peaks was found in whole-cell and vesicular extracts (739.4 *m*/*z*, 755.4 *m*/*z*, 767.5 *m*/*z*, 1341.9 *m*/*z*, 1363.8 *m*/*z*, 2704.7 *m*/*z*, 2732.7 *m*/*z*) (Tables S1 and S4, Figure 9). Both extracts contained 74 and 31 mass peaks, respectively.



Mass peaks common to EVs and whole cell extracts

Figure 9. Comparison of the presence of common mass peaks found in EVs and whole-cell lipid extracts of *C. acnes* strains in MALDI-TOF MS analysis.

3. Discussion

The ability of Gram-negative bacteria to produce outer membrane vesicles (OMV) was first observed in the 1960s by Mergenhagen et al. [24]; however, it was long believed that, due to the thick peptidoglycan layer and the lack of an outer membrane, Grampositive bacteria did not secrete extracellular vesicles. In 1990, conducted research on *Staphylococcus aureus* confirmed the ability of Gram-positive bacteria to release EVs [25]. In these initial studies, vesicle formation was demonstrated using transmission electron microscopy and proteomic analysis [25]. In the group of 90 identified *S. aureus* vesicular proteins, cytoplasmic proteins were the most common, followed by extracellular and membrane proteins. S. aureus-derived EVs are especially enriched with extracellular or membrane-associated virulence proteins, including superantigens, hemolysins, coagulation factors, IgG-binding protein, lipase, and others [25]. Next, many further Gram-positive bacterial species were checked to produce EVs; however, compared to Gram-negative bacteria, the information concerning EV content and structures is insufficient. By means of 1D gel separation and LC-MS/MS analysis, 431 proteins in EVs of *C. perfringens* were identified [26]. The most abundant proteins were derived from the membrane or cytoplasm location; also, many bacterial surface proteins were found. These proteins were involved in metabolic processes.

Few studies are focused on the lipid composition of EVs from Gram-positive bacteria. In *Streptococcus pyogenes*, characteristic differences were observed in the contents, distributions, and fatty acid compositions of specific lipids between EVs and bacterial cell membranes [27]. They found phosphatidylglycerol (PG) enrichment and cardiolipin (CL) depletion, a factor known to dictate membrane curvature in EVs. This differential enrichment of EV lipid species relative to the membrane provides evidence for the dedicated mechanism contributing to EV biogenesis.

This is why there is a need to acquire and perform the complex analysis of extracellular vesicles not only from different species but also within different phylotypes belonging to one species. Herein, we performed a comparative analysis of the protein and lipid content of EVs obtained from three *C. acnes* phylotypes representing the same species.

Despite numerous studies on the participation of *C. acnes* in the pathogenesis of acne, its contribution is still unclear. Moreover, subsequent research not only showed the role of

this species as the cause of acne but also allowed for the differentiation of the participation of individual phylotypes in various pathological conditions. While the *C. acnes* subsp. *acnes* is usually associated with acne, *C. acnes* subsp. *defendens* is more common in healthy skin and infections of deep tissues [28]. Due to the different properties within individual phylotypes, a comparative analysis is necessary. As the discovery of the release of EVs by Gram-positive bacteria is relatively new, many aspects related to the structure and function remain unknown. Due to the fact that both lipids and proteins are active biomolecules, we decided to perform an initial comparative characterization.

In the following work, thioglycollate-soy broth was used for bacterial culture, due to its beneficial properties for anaerobic microorganisms, instead of the frequently used in EV research brain-heart infusion (BHI) [11,29]. Morphological assessments based on TEM analysis confirmed the presence of closed spherical structures, and the DLS analysis allowed us to determine the size of their diameter in the range of 80.15–93.84 nm, which corresponds to the values previously described [22]; however, Jeon et al. (2017) obtained C. acnes EVs with an average diameter of about 38 nm. Research carried out by Jeon et al. [11] confirmed that the EVs proteins differ significantly from individual fractions of cellular proteins. Similar to the strain described therein, in EVs derived from *C. acnes* phylotype II, we found the presence of cytosolic proteins. The sizes of the vesicular proteins obtained from various C. acnes strains were different. The EVs obtained from the PCM 2334 strain contained proteins in the range of 37-75 kDa, while the EVs of DSM 1897 and DSM 16379, were 15–75 kDa and 20 kDa, respectively. Protein profiles of bacterial EVs of Brucella abortus have also been characterized by SDS-PAGE by Araiza-Villanueva et al. It was shown that the profiles contained proteins in the range of 10–92 kDa for *B. abortus* 2308 and 10-139 kDa for B. abortus RB51, which indicates a greater protein richness in this bacterial species [30]. This shows that *C. acnes* EVs seem to have a characteristic narrow protein profile. In proteomic studies of EV of C. acnes type I performed by Jeon et al., 252 vesicular proteins were identified, but more than half of them were poorly characterized [11]. Most of the proteins were associated with the cell membrane and with transport, protein processing, translation, and virulence.

In the case of the *C. acnes* EVs lipids analyzed by TLC, there is also a clear differentiation between the phylotypes; it concerns mainly the amount of lipids present in the extracts, from 6 obtained from phylotype IA1, 8 for phylotype II to 11 from phylotype IB. Analysis of the lipidomic profile in *C. acnes* and their EVs have already been performed by Jeon et al. [29]; however, it concerned one strain of the species *C. acnes* (type IA1). Using LC-MS/MS analysis, they identified 214 different lipids in *C. acnes* and EVs, and 187 lipids were shared. *C. acnes* EV contained substantially more PCs, DGs, PAs, PEs, LPAs, LPCs, and MGs than *C. acnes* cells. In our work, which did not use sophisticated methodology like TLC or SDS-PAGE, we were able to show the difference between EVs secreted by different phylotypes.

What is worth mentioning is that the necessary control was also performed to exclude the presence of proteins and lipids derived from the culture medium, which would interfere with the analysis of the samples. It was shown that no contaminants from the culture medium were present in the SDS-PAGE protein fractions and TLC lipid analysis. MALDI-TOF analysis of mass spectra obtained from the medium showed the presence of a few peaks, some of them may be medium-derived contamination and these values were removed from the EV analysis to preserve the reliability of the research.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Culture and Isolation of Extracellular Vesicles

The following strains of *Cutibacterium acnes* were used in the studies, namely DSM 1897 (type IA1), whole genome shotgun sequence: AWZZ00000000; DSM 16379 (type IB), whole-genome sequence: AE017283, and PCM 2334 (type II) whole-genome sequence: CP003084.

All C. acnes strains were cultivated in thioglycollate-soy broth (TS, Thioglycollate medium, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany, Trypticasein soy broth Biomaxima, Lublin, Poland (1:1, v/v) in anaerobic conditions (GasPack[®] systems, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) at 37 °C. Bacterial strains were taken from the TS solid medium with a sterile loop (10 μ L) and suspended in 5 mL of the liquid TS medium. After 24 h of incubation, the bacterial suspension was transferred to a culture bottle containing 100 mL of liquid TS medium. After 24 h incubation in anaerobic conditions, 25 mL of the bacterial suspension was transferred into a culture bottle containing 500 mL of liquid TS medium and grown for 48 h. When the culture reached the mid-exponential phase (OD600 = 1-1.5), it was centrifuged (Heraeus Biofuge Stratos, Hanau, Germany) at $4000 \times g$ for 10 min, and the supernatant was sterilized using a bottle-top 0.22 µm filter (Stericup® Vacuum Filters, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany). In the next step, ultrafiltration of the supernatant was carried out using an Amicon[®] ultrafiltration system, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany with 100 kDa Ultrafiltration Discs, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany. Then, the concentrate was centrifuged at $4000 \times g$ (Heraeus Biofuge Stratos, Hanau, Germany) for 15 min at 4 °C, and the obtained supernatant was collected and subjected to another centrifugation (15,000 \times g, 15 min, 4 °C, Hermle Z 36 HK, Wehingen, Germany) followed by ultracentrifugation (100,000 \times g, 2 h, 4 °C, Sorvall WX+, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). The pellet of bacterial EVs obtained was suspended in 1–1.5 mL of the PBS buffer and subjected to further analyses.

To check if the culture medium (TS) did not contain extracellular vesicles, the same volume and the same procedure used to isolate extracellular vesicles were used (i.e., ultrafiltration, differential centrifugation, and ultracentrifugation). The sediment formed after ultracentrifugation and supernatant was used to control SDS-PAGE analysis. Also, the supernatant after ultracentrifugation and Bligh-Dyer extraction was used as a control in TLC and MALDI-TOF MS analyses.

4.2. TEM and DLS

EVs were analyzed using transmission electron microscopy (TEM). For TEM analysis, 5 μ L of the EVs sample in PBS was loaded on a 400 mesh copper grid with formvar/carbon film and left to absorb for 60 s. Then, the preparation was dried with filter paper. Next, it was negatively stained with 2% uranyl acetate. The images were taken using a JEM-F200 transmission electron microscope (JEOL, Akishima, Japan).

Measurements of the size of bacterial EVs were carried out using dynamic light scattering analysis (DLS, Malvern Zetasizer, Malvern, UK). Extracellular vesicles dissolved in PBS buffer (100 μ L) were measured in triplicate on DLS Malvern Zetasizer Nano ZS using Zetasizer software version 8.01.4906.

4.3. SDS-PAGE Analysis of EV and Cutibacterium Protein Fractions

The obtained EVs were analyzed with SDS-PAGE together with protein fractions derived from individual *C. acnes* strains. To prepare protein fractions, the culture of *C. acnes* was centrifuged, Heraeus Biofuge Stratos, Hanau, Germany ($4000 \times g$, 10 min, 4 °C) and washed three times with PBS. The bacterial pellet obtained in this way was re-suspended in PBS and divided into four parts.

The first one, which was dedicated to obtaining bacterial surface proteins, was centrifuged again, Heraeus Biofuge Stratos, Hanau, Germany ($4000 \times g$, 10 min, 4 °C), suspended in freshly prepared 1 M lithium chloride solution (3 mL for 1 g of the bacterial pellet), and shaken for 30 min at room temperature. Then, it was centrifuged, Heraeus Biofuge Stratos, Hanau, Germany ($4000 \times g$, 10 min, 4 °C), and the supernatant was collected and precipitated with cold ethanol in a ratio of 1:9 (protein fraction—ethanol 96%, v/v) and left overnight at 4 °C. After overnight precipitation, the proteins were centrifuged ($4000 \times g$, 10 min, 4 °C), suspended in 2 mL of MQ water, and dialyzed for 72 h (Dialysis membrane ZelluTrans/ROTH, MWCO 6000–8000, Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Germany). The concentration of the surface proteins fraction and EVs fraction was determined

using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce[™] BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher, Rockford, IL, USA).

Further protein fractions, i.e., cell wall, cytosol, and whole-cell lysate, were prepared according to Jeon et al. [11]: the cell wall fraction was prepared using lysozyme, whole-cell lysate (using sonication), and cell cytoplasm (using sonication and gradual centrifugation). Bacterial EVs, together with corresponding protein fractions, were analyzed at a concentration of 10 µg per well on SDS-PAGE (4% polyacrylamide stacking gel, 12.5% polyacrylamide separating gel). Proteins were detected by silver staining.

4.4. Lipid Extraction

For lipid analysis, C. acnes strains (DSM 16379, DSM 1897, and PCM 2334) were cultivated in thioglycollate-soy broth (TS), as above, in an anaerobic chamber (using GasPack systems, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) at 37 °C for 5 days to reach the stationary growth phase. The culture was then centrifuged at $4000 \times g$, for 10 min, and washed twice with PBS and once with MQ water. The pellet obtained was deep-frozen at -80 °C and subsequently freeze-dried. Both EVs and dry cell mass of *C. acnes* were extracted according to the Bligh-Dyer method to obtain lipids [31]. For lipid analysis, 50 mg of dry cell mass and the 0.5 milliliters of EVs fraction and as control, 0.5 mL of TS medium were used. Dry cell mass was suspended in 1 mL of MQ water and then 3.75 mL (1.875 mL for EVs and TS medium fractions) of methanol-chloroform (2:1, v/v) was added. The mixtures were shaken for 24 h at 20 °C. After centrifugation, the extract was decanted into another tube and the residue was re-suspended in 4.75 mL (2.375 mL for EVs and TS medium fractions) of methanol-chloroform-water (2:1:0.8, v/v/v) and shaken for 2 h at 20 °C. After centrifugation, the supernatant extracts were combined and 2.5 mL (1.25 mL for EVs and TS medium fractions) each of chloroform and MQ water were added. After shaking for 3 min, the mixture was centrifuged to separate the water and chloroform phases completely. The chloroform phase containing crude lipids was withdrawn, brought to dryness under a stream of nitrogen, and stored at -20 °C.

4.5. TLC Analysis

Lipids were dissolved in chloroform-methanol (2:1, v/v) and applied at a concentration of 50 mg/mL to a 10 cm × 10 cm HPTLC Silica gel 60 (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany). The TLC plate was developed in the first direction using solvent system (I) chloroform-methanol-water (65:25:4, v/v) for 25 min at 20 °C, and then after drying, in the second direction with the solvent system (II) chloroform-methanol-acetic acid-water (80:15:12:4, v/v) under the same conditions. After evaporation of the mobile phase, the plate was sprayed with a reagent containing 300 mM CuSO₄ in 8.5% phosphoric acid [32] and then placed at 130 °C for 20 min to visualize all lipids.

4.6. MALDI-TOF MS Analysis

The lipids were dissolved in chloroform-methanol (2:1, v/v) and applied to the target plate (MTP 384 ground steel BC, Bruker, Billerica, MA, USA) at a concentration of 1 mg/mL. The matrix used was norharmane at a concentration of 10 mg/mL in the same solvent. We used the dried droplet preparation protocol, 1 µL of the sample after drying on air was overlaid with 1 µL of the matrix solution. The MALDI-TOF analysis was performed with the Ultraflextreme mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) in positive ion mode using FlexAnalysis software (version 3.4). The spectrometer was calibrated using peptide calibration standard II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) with a mass range of 757.399 to 3147.471 m/z.

5. Conclusions

In this work, for the first time, we conducted a comparative analysis of the protein and lipid profiles of EVs obtained from three different *C. acnes* phylotypes. The applied techniques allowed us to show that bacterial EVs differ significantly in protein and lipid composition, depending on the phylotype from which they are isolated. This requires an individual approach to studying these nanostructures within a species. Our results are the background for further analyses that will allow the precise characterization of the qualitative protein and lipid composition. Due to our in-depth understanding of the structure and biological functions of bacterial EVs, they could become a useful tool as drug carriers or in vaccine production.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23105797/s1.

Author Contributions: Conceptualization, M.P. and A.C.; methodology, A.C. and M.P.; software, A.C.; validation, M.P. and A.C.; formal analysis, M.P.; investigation, A.C.; resources, M.P. and A.C.; data curation, A.C.; writing—original draft preparation, A.C.; writing—review and editing, M.P.; visualization, A.C. and P.M.; supervision, M.P.; project administration, M.P.; funding acquisition, M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data used to support the findings of this study are included within the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: The authors are most grateful to Paulina Deptula (University of Copenhagen) for providing the *C. acnes* DSM 1897 and 16379 strains used in the study. The authors would like to thank Tomasz Goszczyński (Laboratory of Biomedical Chemistry, IIET PAS) for the possibility of using DLS equipment.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Bose, S.; Aggarwal, S.; Singh, D.V.; Acharya, N. Extracellular vesicles: An emerging platform in gram-positive bacteria. *Microb. Cell* 2020, 7, 312–322. [CrossRef] [PubMed]
- Chudzik, A.; Paściak, M. Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako mediatory komunikacji międzykomórkowej. Postepy Hig. Med. Dosw. 2020, 74, 572–588. [CrossRef]
- Tsai, Y.L.; Tsai, W.C.; Qing, Z.; Chang, C.J. Dichotomous effects of microbial membrane vesicles on the regulation of immunity. *Med. Microecol.* 2020, *3*, 100009. [CrossRef]
- 4. Nagakubo, T.; Nomura, N.; Toyofuku, M. Cracking Open Bacterial Membrane Vesicles. Front. Microbiol. 2020, 10, 3026. [CrossRef]
- 5. Dagnelie, M.A.; Corvec, S.; Khmarri, A.; Dreno, B. Bacterial extracellular vesicles: A new way to decipher host-microbiota communications in inflammatory dermatoses. *Exp. Dermatol.* **2020**, *29*, 22–28. [CrossRef]
- 6. Haas-Neill, S.; Forsythe, P. A Budding Relationship: Bacterial Extracellular Vesicles in the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8899. [CrossRef]
- Ñahui Palomino, R.A.; Vanpouille, C.; Costantini, P.E.; Margolis, L. Microbiota–host communications: Bacterial extracellular vesicles as a common language. *PLoS Pathog.* 2021, 17, e1009508. [CrossRef]
- Herrmann, I.K.; Wood, M.J.A.; Fuhrmann, G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat. Nanotechnol.* 2021, 16, 748–759. [CrossRef]
- Sabanovic, B.; Piva, F.; Cecati, M.; Giulietti, M. Promising Extracellular Vesicle-Based Vaccines against Viruses, Including SARS-CoV-2. *Biology* 2021, 10, 94. [CrossRef]
- Bek-Thomsen, M.; Lomholt, H.B.; Kilian, M. Acne is Not Associated with Yet-Uncultured Bacteria. J. Clin. Microbiol. 2008, 46, 3355–3360. [CrossRef]
- Jeon, J.; Mok, H.J.; Choi, Y.; Park, S.C.; Jo, H.; Her, J.; Han, J.K.; Kim, Y.K.; Kim, K.P.; Ban, C. Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from Propionibacterium acnes. *Prot. Clin. Appl.* 2017, *11*, 1600040. [CrossRef] [PubMed]
- Dessinioti, C.; Katsambas, A.D. The role of Propionibacterium acnes in acne pathogenesis: Facts and controversies. *Clin. Dermatol.* 2010, 28, 2–7. [CrossRef] [PubMed]
- Mollerup, S.; Friis-Nielsen, J.; Vinner, L.; Hansen, T.A.; Richter, S.R.; Fridholm, H.; Herrera, J.A.R.; Lund, O.; Brunak, S.; Izarzugaza, J.M.G.; et al. Propionibacterium acnes: Disease-Causing Agent or Common Contaminant? Detection in Diverse Patient Samples by Next-Generation Sequencing. J. Clin. Microbiol. 2016, 54, 980–987. [CrossRef]
- 14. Platsidaki, E.; Dessinioti, C. Recent advances in understanding Propionibacterium acnes (Cutibacterium acnes) in acne. *F1000Research* **2018**, *7*, 1953. [CrossRef] [PubMed]

- Nouioui, I.; Carro, L.; García-López, M.; Meier-Kolthoff, J.P.; Woyke, T.; Kyrpides, N.C.; Pukall, R.; Klenk, H.P.; Goodfellow, M.; Göker, M. Genome-Based Taxonomic Classification of the Phylum Actinobacteria. *Front. Microbiol.* 2018, *9*, 2007. [CrossRef] [PubMed]
- Dekio, I.; McDowell, A.; Sakamoto, M.; Tomida, S.; Ohkuma, M. Proposal of the new combination, Cutibacterium acnes subsp. elongatum comb. nov., and emended descriptions of the genus Cutibacterium, Cutibacterium acnes subsp. acnes and Cutibacterium acnes subsp. defendens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019, 69, 1087–1092. [CrossRef]
- Kilian, M.; Scholz, C.F.P.; Lomholt, H.B. Multilocus Sequence Typing and Phylogenetic Analysis of Propionibacterium acnes. J. Clin. Microbiol. 2012, 50, 1158–1165. [CrossRef] [PubMed]
- 18. Scholz, C.F.P.; Jensen, A.; Lomholt, H.B.; Brüggemann, H.; Kilian, M. A Novel High-Resolution Single Locus Sequence Typing Scheme for Mixed Populations of Propionibacterium acnes In Vivo. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104199. [CrossRef]
- McDowell, A.; Nagy, I.; Magyari, M.; Barnard, E.; Patrick, S. The Opportunistic Pathogen Propionibacterium acnes: Insights into Typing, Human Disease, Clonal Diversification and CAMP Factor Evolution. *PLoS ONE* 2013, *8*, e70897. [CrossRef]
- Cohen, R.J.; Shannon, B.A.; McNEAL, J.E.; Shannon, T.O.M.; Garrett, K.L. Propionibacterium acnes associated with inflammation in radical prostatectomy specimens: A possible link to cancer evolution. *J. Urol.* 2005, 173, 1969–1974. [CrossRef]
- Yu, Y.; Champer, J.; Agak, G.W.; Kao, S.; Modlin, R.L.; Kim, J. Different Propionibacterium acnes Phylotypes Induce Distinct Immune Responses and Express Unique Surface and Secreted Proteomes. J. Investig. Dermatol. 2016, 136, 2221–2228. [CrossRef] [PubMed]
- 22. Choi, E.J.; Lee, H.G.; Bae, I.H.; Kim, W.; Park, J.; Lee, T.R.; Cho, E.G. Propionibacterium acnes-Derived Extracellular Vesicles Promote Acne-Like Phenotypes in Human Epidermis. *J. Investig. Dermatol.* **2018**, 138, 1371–1379. [CrossRef] [PubMed]
- 23. Prados-Rosales, R.; Brown, L.; Casadevall, A.; Montalvo-Quirós, S.; Luque-Garcia, J.L. Isolation and identification of membrane vesicle-associated proteins in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *MethodsX* **2014**, *1*, 124–129. [CrossRef] [PubMed]
- 24. Mergenhagen, S.E.; Bladen, H.A.; Hsu, K.C. Electron microscopic localization of endotoxic lipopolysaccharide in Gram-negative organisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1966**, *133*, 279–291. [CrossRef]
- Lee, E.Y.; Choi, D.Y.; Kim, D.K.; Kim, J.W.; Park, J.O.; Kim, S.; Kim, S.H.; Desiderio, D.M.; Kim, Y.K.; Kim, K.P.; et al. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles. *Proteomics* 2009, 9, 5425–5436. [CrossRef]
- 26. Jiang, Y.; Kong, Q.; Roland, K.L.; Curtiss, R. Membrane vesicles of Clostridium perfringens type A strains induce innate and adaptive immunity. *Int. J. Med. Microbiol.* **2014**, 304, 431–443. [CrossRef]
- Resch, U.; Tsatsaronis, J.A.; Le Rhun, A.; Stübiger, G.; Rohde, M.; Kasvandik, S.; Holzmeister, S.; Tinnefeld, P.; Wai, S.N.; Charpentier, E. A Two-Component Regulatory System Impacts Extracellular Membrane-Derived Vesicle Production in Group A Streptococcus. *mBio* 2016, 7, e00207–e00216. [CrossRef]
- Spittaels, K.J.; Ongena, R.; Zouboulis, C.C.; Crabbé, A.; Coenye, T. Cutibacterium acnes Phylotype I and II Strains Interact Differently With Human Skin Cells. Front. Cell. *Infect. Microbiol.* 2020, 10, 575164.
- 29. Jeon, J.; Park, S.C.; Her, J.; Lee, J.W.; Han, J.K.; Kim, Y.K.; Kim, K.P.; Ban, C. Comparative lipidomic profiling of the human commensal bacterium Propionibacterium acnes and its extracellular vesicles. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 15241–15247. [CrossRef]
- Araiza-Villanueva, M.; Avila-Calderón, E.D.; Flores-Romo, L.; Calderón-Amador, J.; Sriranganathan, N.; Qublan, H.A.; Witonsky, S.; Aguilera-Arreola, M.; Ruiz-Palma, M.D.S.; Ruiz, E.A.; et al. Proteomic analysis of membrane blebs of Brucella abortus 2308 and RB51 and their evaluation as an acellular vaccine. *Front. Microbiol.* 2019, *10*, 2714. [CrossRef]
- Breil, C.; Abert Vian, M.; Zemb, T.; Kunz, W.; Chemat, F. "Bligh and Dyer" and Folch Methods for Solid–Liquid–Liquid Extraction of Lipids from Microorganisms. Comprehension of Solvatation Mechanisms and towards Substitution with Alternative Solvents. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, *18*, 708. [CrossRef] [PubMed]
- Knoke, L.R.; Abad Herrera, S.; Götz, K.; Justesen, B.H.; Günther Pomorski, T.; Fritz, C.; Schäkermann, S.; Bandow, J.E.; Aktas, M. Agrobacterium tumefaciens Small Lipoprotein Atu8019 Is Involved in Selective Outer Membrane Vesicle (OMV) Docking to Bacterial Cells. Front. Microbiol. 2020, 11, 1228. [CrossRef] [PubMed]

Supplementary material

Different Cutibacterium acnes phylotypes release distinct extracellular vesicles

Anna Chudzik, Paweł Migdał, Mariola Paściak

SDS-PAGE analysis of pure culture medium in order to exclude the influence of the medium on the measurement (Fig. S1). The absence of proteins in lanes 2-4 indicates the absence of media derived proteins by SDS-PAGE analysis.



Figure S1. SDS-PAGE of pure culture medium and EVs fractions in order to exclude the influence of the medium on the measurement. 1. Marker. 2. Pure culture medium sterilized using filters with a 0.22 μ m membrane. 3. The sediment formed after ultracentrifugation and the procedure identical to that during the extraction of EVs was carried out. 4. Supernatant formed after ultracentrifugation and the procedure identical to that during the extraction of EVs was carried out. 5-6. EVs isolated from *C. acnes* DSM 1897 (different concentrations), 7-8. EVs isolated from *C. acnes* PCM 2334 (different concentrations).

TLC lipid profile analysis of pure culture medium in order to exclude the influence of the medium on the measurement (Fig. S2). The absence of lipid spots proves the absence of lipids in the medium obtained after ultracentrifugation and the procedure identical to that in the collection of EVs.



Figure S2. 2D-TLC lipid analysis of medium obtained after ultracentrifugation and the procedure identical to that in the collection of EVs. The TLC was developed in (I) chloroform-methanol-water (65:25:4, v/v), II chloroform-methanol-acetic acid-water (80:15:12:4, v/v) and for the detection of lipids copper sulphate reagent and heating at 130 °C were applied.

List of MALDI-TOF MS mass peaks for EVs lipid extract of C. acnes strains

Table S1. List of MALDI-TOF MS mass peaks for EVs lipid extract of *C. acnes* DSM 1897 strain. Yellow lines have been removed from the analysis as medium contamination

m/z	time	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.	FWHM	Chi^2
711,389	42172,89	25563,309	34,636	36116,541	8015,775	4003,673	0,125	0,089	206717,160
733,367	42813,17	18993,222	25,610	15318,980	7095,269	3544,881	0,093	0,103	278931,075
739,419	42987,78	19890,160	26,771	17291,731	7822,527	3381,346	0,097	0,095	244135,607
755,390	43445,15	7731,539	9,954	2209,243	7118,319	1451,965	0,038	0,106	118491,887
767,450	43787,31	6946,941	8,782	651,892	6328,500	1423,414	0,034	0,121	338525,905
821,036	45275,92	5795,718	6,920	2039,308	2289,473	3808,923	0,028	0,359	172808,985
827,431	45450,28	10663,669	13,286	6118,079	7884,772	2014,940	0,052	0,105	91629,531
843,391	45882,47	9055,039	11,160	1161,762	6532,557	2111,055	0,044	0,129	484817,382
860,390	46338,33	30430,704	38,961	50135,102	8486,466	5879,593	0,148	0,101	322173,795
865,419	46472,33	34006,188	43,538	46918,562	8170,623	6848,301	0,166	0,106	578305,111
867,443	46526,14	11709,005	14,524	6688,120	6615,598	3019,078	0,057	0,131	140784,949
882,375	46921,24	32232,199	41,083	21524,687	7309,481	7696,830	0,157	0,121	1297085,461
889,454	47107,36	7477,423	8,903	6149,865	8585,773	1391,908	0,036	0,104	39477,889
898,335	47339,82	5697,298	6,582	1023,760	5085,481	1991,501	0,028	0,177	195052,823
911,424	47680,33	205162,012	263,557	82657,014	7745,196	48505,837	1,000	0,118	28028602,253
927,401	48092,68	30801,950	38,671	60177,262	8662,161	6593,274	0,150	0,107	325134,240
933,409	48246,81	145036,643	185,793	97633,825	7676,709	35976,628	0,707	0,122	12163930,681
949,385	48654,28	29394,690	36,726	18891,211	8181,867	6972,449	0,143	0,116	1080184,750
982,474	49487,38	10484,347	12,537	3876,504	8253,082	2412,480	0,051	0,119	152821,970
987,512	49612,97	13059,084	15,859	5597,823	9200,691	2740,584	0,064	0,107	232135,225
998,457	49884,74	6912,082	7,985	1569,541	8413,088	1620,641	0,034	0,119	163599,592
1010,497	50181,97	8088,028	9,518	331,259	9599,011	1652,112	0,039	0,105	1177432,862
1024,507	50525,62	13383,308	16,245	5431,398	8792,507	3071,956	0,065	0,117	198178,006
1033,497	50744,88	14192,704	17,201	1942,174	8744,182	3435,751	0,069	0,118	1084420,200
1046,492	51060,15	9055,760	10,657	888,774	7865,347	2404,554	0,044	0,133	550209,183
1076,518	51781,16	13080,114	15,809	4041,520	9523,034	3106,848	0,064	0,113	509666,890
1078,530	51829,11	12007,463	14,405	1079,739	8143,272	3413,122	0,059	0,132	1071275,215
1100,548	52350,95	7969,839	9,258	826,002	10176,066	1688,577	0,039	0,108	473422,382
1105,501	52467,62	12527,914	15,060	9673,942	9512,755	3157,582	0,061	0,116	168424,821
1108,585	52540,14	9193,187	10,746	922,335	5403,019	4025,552	0,045	0,205	743482,562
1122,523	52866,58	147330,594	187,663	83908,915	8566,182	43616,031	0,718	0,131	15014771,209
1138,500	53238,29	21368,570	26,324	29112,798	8945,204	6216,232	0,104	0,127	342254,531
1144,511	53377,46	179717,319	229,447	119147,364	7561,536	63955,645	0,876	0,151	19284575,954
1160,491	53745,67	32942,944	41,399	30252,573	8162,106	11022,490	0,161	0,142	1300558,578
1193,572	54499,92	5597,985	6,303	1358,509	10367,845	1327,398	0,027	0,115	122045,955
1209,562	54860,74	5830,978	6,672	1002,305	8106,156	1952,483	0,028	0,149	226131,207
1222,604	55153,25	6577,621	7,695	262,852	8316,601	2122,177	0,032	0,147	1124036,900
1231,554	55353,08	6342,114	7,415	1111,910	7298,592	2457,971	0,031	0,169	250107,779
1235,616	55443,55	11869,177	14,724	3612,341	9609,657	3482,417	0,058	0,129	326569,666

1244,593	55642,93	8558,530	10,387	882,987	8170,669	3057,712	0,042	0,152	591163,953
1257,599	55930,51	13484,477	16,936	4451,135	8956,620	4550,149	0,066	0,140	566959,339
1341,852	57758,47	8036,773	10,179	2773,941	10301,067	2514,128	0,039	0,130	156031,703
1344,642	57818,02	5130,420	6,193	645,612	7030,599	2351,539	0,025	0,191	329457,326
1363,818	58225,51	5756,157	7,177	664,707	3619,862	4809,256	0,028	0,377	569999,877
1385,647	58685,93	25508,710	35,657	82244,602	10566,960	8928,400	0,124	0,131	302836,479
1401,638	59020,89	5038,231	6,366	815,594	9028,252	1927,789	0,025	0,155	243286,146
1655,818	64108,26	3756,328	6,205	482,298	10446,820	1640,695	0,018	0,158	271538,515
1854,876	67823,80	3492,292	7,602	863,730	11474,875	1813,453	0,017	0,162	147770,805
1985,917	70161,38	12353,784	39,547	39982,662	14517,393	5893,837	0,060	0,137	249924,178
1994,049	70303,86	3025,735	8,624	3663,019	12077,856	1443,714	0,015	0,165	26241,513
2002,911	70458,79	3944,856	11,987	1173,667	12521,488	2076,006	0,019	0,160	164611,974
2090,095	71965,08	2377,494	7,752	1789,172	14364,798	960,937	0,012	0,146	29642,993
2093,129	72016,92	5345,026	20,018	19340,146	14621,301	2500,834	0,026	0,143	41841,817
2207,168	73939,03	1949,459	7,806	2208,915	13029,945	966,667	0,010	0,169	18115,060
2704,701	81793,28	1236,879	10,856	2001,862	9779,409	1078,183	0,006	0,277	13293,905
2732,736	82213,31	1281,717	11,842	2029,625	8387,747	1334,462	0,006	0,326	16224,513

m/z	time	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.	FWHM	Chi^2
707,338	42053,80	8595,439	7,516	919,683	4441,440	2291,304	0,061	0,159	414354,978
739,424	42987,91	28358,327	26,694	12987,415	5966,886	6438,395	0,202	0,124	1018176,438
751,356	43330,08	7370,162	6,145	136,931	5559,242	1635,198	0,053	0,135	2008958,273
755,395	43445,30	7266,115	6,033	1232,385	7100,977	1211,827	0,052	0,106	164706,531
767,448	43787,24	8040,943	6,751	255,711	3400,850	2859,946	0,057	0,226	1368277,586
805,455	44848,26	8377,030	7,034	2768,136	7294,448	1521,239	0,060	0,110	93572,530
812,361	45038,32	21036,329	19,403	4735,415	6665,582	4786,721	0,150	0,122	1093730,245
827,431	45450,28	51352,525	48,963	38425,522	6545,634	12634,918	0,366	0,126	2017743,200
834,339	45637,85	20811,809	19,132	8280,880	6277,632	5271,830	0,148	0,133	668657,792
843,401	45882,75	18017,022	16,402	7340,204	6304,412	4455,778	0,128	0,134	542765,575
855,463	46206,68	21401,762	19,694	7632,420	6208,602	5553,900	0,153	0,138	867100,967
860,395	46338,47	25275,696	23,506	22578,781	7131,186	5811,319	0,180	0,121	390119,364
865,419	46472,32	23916,879	22,196	14672,943	6948,444	5585,757	0,171	0,125	477444,820
871,438	46632,16	9504,469	8,077	1455,180	6504,603	2256,629	0,068	0,134	270091,112
882,374	46921,21	38699,333	36,765	21676,120	6714,925	10125,327	0,276	0,131	1802530,738
901,511	47422,68	10958,107	9,411	3232,242	7352,917	2382,519	0,078	0,123	159468,579
911,426	47680,39	136080,805	133,387	89357,489	7450,162	33971,650	0,970	0,122	7853789,461
923,492	47992,14	18577,521	16,903	6053,450	6951,842	4609,151	0,132	0,133	441541,648
927,404	48092,77	14888,876	13,270	6296,817	6877,195	3822,156	0,106	0,135	281401,703
929,537	48147,54	7654,175	6,068	693,862	6474,534	1856,594	0,055	0,144	335918,333
933,405	48246,72	140238,087	137,627	95359,211	7354,664	36901,130	1,000	0,127	10424579,602
949,375	48654,02	21313,840	19,712	3493,346	6902,048	5983,258	0,152	0,138	1104404,671
951,536	48708,87	11902,998	10,330	591,907	4132,780	4875,807	0,085	0,230	1409719,889
982,482	49487,58	9171,360	7,741	2035,378	7716,328	2022,233	0,065	0,127	175255,265
987,507	49612,85	10997,001	9,661	2162,847	7413,730	2657,927	0,078	0,133	260871,764
989,487	49662,13	17611,438	16,361	11232,941	6941,857	4997,039	0,126	0,143	383050,316
1005,459	50057,81	7434,611	6,081	582,390	6973,446	1911,469	0,053	0,144	457798,321
1023,482	50500,55	10847,698	9,661	328,289	7043,958	2989,273	0,077	0,145	2068270,485
1033,491	50744,75	10224,827	9,072	1010,988	7968,762	2530,229	0,073	0,130	517663,068
1045,457	51035,12	13589,235	12,607	536,356	6611,229	4327,770	0,097	0,158	2293019,205
1105,508	52467,78	9662,485	8,743	801,065	7638,958	2779,040	0,069	0,145	741161,843
1122,530	52866,75	48430,864	50,763	76169,818	8252,554	14869,834	0,345	0,136	1213052,237
1144,508	53377,41	74715,953	80,056	47337,910	7885,700	25436,003	0,533	0,145	5960745,112
1160,480	53745,42	11012,760	10,471	1479,603	7266,626	3810,523	0,079	0,160	481557,018
1213,698	54953,67	14810,618	15,330	2410,674	7607,498	5210,922	0,106	0,160	676860,806
1257,601	55930,57	8298,134	8,266	1310,422	6657,697	3372,072	0,059	0,189	329167,473
1341,855	57758,55	6793,626	7,112	1615,698	8160,805	2307,190	0,048	0,164	158891,148
1363,837	58225,92	10362,894	12,220	2339,077	7657,981	4331,814	0,074	0,178	321548,490
1385,649	58685,97	5992,834	6,395	1597,534	8788,259	2014,422	0,043	0,158	124712,257
1391,873	58816,57	6754,319	7,521	612,535	5989,723	3352,738	0,048	0,232	475628,718

Table S2. List of MALDI-TOF MS mass peaks for EVs lipid extract of *C. acnes* DSM 16379 strain. Green and yellow lines have been removed from the analysis as matrix and medium contamination respectively.

1437,921	59773,87	10617,966	13,987	10090,757	10037,082	3697,805	0,076	0,143	133079,341
1465,950	60349,07	7000,917	8,878	1784,702	8261,204	2923,120	0,050	0,177	176414,961

m/z	time	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.	FWHM	Chi^2
711,393	42173,01	25249,087	20,923	29540,956	7745,320	4044,495	0,073	0,092	149076,751
717,453	42350,54	8939,198	7,015	3632,921	7746,894	1388,920	0,026	0,093	103718,974
733,370	42813,26	19925,299	16,190	20241,996	6666,730	3908,831	0,058	0,110	150896,112
739,425	42987,95	39700,838	32,918	23511,336	7490,231	7098,064	0,115	0,099	876549,036
755,400	43445,44	13491,777	10,713	3885,651	7095,387	2517,013	0,039	0,106	200225,057
812,365	45038,43	27064,829	21,595	7490,707	7706,214	5306,403	0,078	0,105	1120210,424
827,436	45450,41	25356,072	19,865	11629,126	7322,188	5361,726	0,073	0,113	691243,575
834,345	45638,01	19857,146	15,336	3585,534	6761,357	4675,293	0,057	0,123	1038037,317
843,404	45882,83	16878,082	12,862	1999,943	6244,348	4128,087	0,049	0,135	944631,563
860,397	46338,53	45410,612	35,644	52986,345	7888,167	9428,012	0,131	0,109	741564,875
865,424	46472,46	51969,095	40,835	65880,229	7743,514	11085,086	0,150	0,112	973286,514
867,440	46526,04	17810,212	13,481	3696,974	6918,970	4342,056	0,051	0,125	444557,840
882,380	46921,36	55358,125	43,221	25835,283	7051,983	13723,599	0,160	0,125	3274902,108
889,463	47107,59	14248,120	10,457	9349,387	7949,680	2883,579	0,041	0,112	101955,831
898,348	47340,17	10537,159	7,491	560,704	5571,714	3314,777	0,030	0,161	1351479,924
911,432	47680,55	346406,000	273,331	128858,599	7603,979	83050,036	1,000	0,120	49422099,823
927,410	48092,91	48571,566	37,209	68600,952	8123,200	11030,142	0,140	0,114	773276,102
933,415	48246,98	255667,373	200,702	93687,261	7311,179	66612,652	0,738	0,128	39465583,533
949,394	48654,51	53010,019	40,471	29496,587	7871,341	12937,263	0,153	0,121	2493729,895
982,484	49487,64	17692,619	12,806	4709,504	7911,090	4158,091	0,051	0,124	350569,625
987,520	49613,18	18687,768	13,658	4465,944	8483,287	4198,663	0,054	0,116	507733,013
998,464	49884,92	10394,521	7,137	535,731	7174,517	2805,487	0,030	0,139	1076494,981
1004,468	50033,36	10065,378	6,886	387,631	7393,477	2553,967	0,029	0,136	1529936,470
1008,495	50132,69	17894,414	12,955	1307,475	7656,529	4673,725	0,052	0,132	1912261,045
1010,510	50182,31	12663,105	8,880	334,536	7817,285	3133,250	0,037	0,129	2975472,076
1023,469	50500,25	17280,200	12,455	1124,019	9080,865	3818,280	0,050	0,113	1512018,931
1024,505	50525,57	19606,963	14,275	1672,144	7505,330	5205,536	0,057	0,137	1691982,887
1030,468	50671,11	12761,220	8,903	376,499	6840,665	3930,669	0,037	0,151	2849727,067
1033,504	50745,05	21933,808	16,041	1487,688	7770,787	5970,036	0,063	0,133	3244777,880
1045,466	51035,34	22306,576	16,274	2894,410	6756,692	7140,279	0,064	0,155	2159704,085
1046,507	51060,52	17968,914	12,886	478,105	8863,199	4255,890	0,052	0,118	3686312,869
1061,493	51421,65	10677,721	7,221	302,325	5704,612	3845,160	0,031	0,186	2314922,856
1076,529	51781,43	18155,286	12,998	2653,021	8626,052	4573,592	0,052	0,125	931776,099
1078,538	51829,31	17793,167	12,682	1171,725	8303,395	4730,472	0,051	0,130	1774452,712
1100,563	52351,32	12708,069	8,752	656,674	8858,034	2982,809	0,037	0,124	1624605,559
1105,517	52467,99	23192,673	16,824	14503,199	8490,921	6462,773	0,067	0,130	462159,387
1108,595	52540,36	12988,520	8,894	799,005	5025,601	5939,203	0,037	0,221	1581579,271
1122,537	52866,90	212886,146	163,586	119581,867	8235,001	64496,715	0,615	0,136	19196390,540
1138,517	53238,69	30693,263	22,622	20577,633	8385,404	9160,831	0,089	0,136	791372,651
1144,521	53377,71	289919,776	223,766	56785,526	7273,728	105887,213	0,837	0,157	76850945,618
1160,502	53745,93	54416,615	41,249	28014,219	7833,143	18689,168	0,157	0,148	3249197,938

Table S3. List of MALDI-TOF MS mass peaks for EVs lipid extract of *C. acnes* PCM 2334 strain. Yellow lines have been removed from the analysis as medium contamination.

1209,562	54860,73	9395,384	6,329	486,990	7446,066	3326,044	0,027	0,162	1232459,356
1215,568	54995,64	9008,921	6,048	628,450	7351,377	3182,917	0,026	0,165	831981,459
1222,619	55153,59	9961,933	6,835	243,846	7886,894	3194,175	0,029	0,155	2544194,623
1231,562	55353,26	10268,799	7,107	949,390	7066,188	3977,305	0,030	0,174	735543,629
1235,633	55443,94	17141,165	12,636	2562,311	8889,168	5183,465	0,049	0,139	754150,793
1244.607	55643.24	15196.288	11.165	361.303	7900.964	5457.801	0.044	0.158	4554053.125
1257.612	55930.80	21817.000	16,630	3615.856	8659,444	7372.888	0.063	0,145	1378769.302
1341.876	57758.99	9059.433	6,579	456.859	5931.177	4243.006	0.026	0.226	1386544.798
1363.793	58224.99	9082.693	6.702	1149,793	3496,449	7954,794	0.026	0.390	848232.291
1385.663	58686.26	46040.032	39,231	78578.054	9802,566	16848,314	0.133	0,141	994824,119
1401.655	59021.24	10034.921	7.813	1407.637	8750.518	3893.089	0.029	0,160	546950,509
1655 825	64108 38	5979 858	6 103	954 976	9072 097	2935 693	0.017	0.183	329771 511
1683 843	64644 41	5709 634	6,056	1950 664	9839 222	2711 857	0.016	0.171	139274 494
1854 894	67824.12	5025.469	6 888	1198.024	10679 318	2670 366	0.015	0.174	208425 534
1985 938	70161.75	15044 484	32,700	17361 //32	12/30 881	8015 668	0.043	0.160	381050 400
2001 921	70441 51	4720 807	9 369	580.936	11/08///5	2523.012	0.014	0.174	436550.081
2093,133	72017,00	3254,461	7,295	2353,304	10297,157	1878,581	0,009	0,203	46004,830
List of MALDI-TOF MS mass peaks for cellular lipid extract of C. acnes strains

Table S4. List of MALDI-TOF MS mass peaks for cellular lipid extract of *C. acnes* DSM 1897 strain. Yellow lines have been removed from the analysis as medium contamination.

m/z	time	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.	FWHM	Chi^2
717,498	42351,87	28512,136	50,122	90435,179	6775,879	5457,589	0,107	0,106	227585,925
723,501	42526,95	4153,259	6,240	468,348	3100,359	1478,959	0,016	0,233	278068,909
739,467	42989,16	244380,862	442,243	128773,644	5516,324	62024,403	0,921	0,134	24417246,417
745,532	43163,41	6055,326	9,401	5168,208	5233,251	1390,901	0,023	0,142	100734,777
753,486	43390,88	6771,023	10,695	5367,739	4913,012	1701,424	0,026	0,153	150574,295
755,445	43446,71	19366,872	33,531	55120,488	5861,055	4547,597	0,073	0,129	210786,670
767,498	43788,66	50091,002	89,859	82059,500	5868,889	12360,575	0,189	0,131	1262950,743
783,467	44237,58	4880,098	7,352	697,299	5215,949	1172,607	0,018	0,150	471267,087
805,509	44849,75	39853,433	71,668	84317,235	7122,287	8534,269	0,150	0,113	602191,515
811,505	45014,80	4659,530	6,864	718,237	4598,969	1291,481	0,018	0,176	304402,356
823,380	45339,93	4385,766	6,059	722,114	2704,925	2109,492	0,017	0,304	181554,007
825,302	45392,32	10944,765	18,247	333,827	4760,807	3521,487	0,041	0,173	20582235,008
827,482	45451,65	265381,924	491,083	134954,999	5493,748	79979,327	1,000	0,151	34073247,574
833,543	45616,28	7229,866	11,359	9660,258	5380,599	1914,839	0,027	0,155	106194,403
839,500	45777,49	6058,775	9,194	4018,164	4546,447	1854,424	0,023	0,185	142304,173
841,506	45831,65	6336,874	9,721	1779,669	4173,993	2119,421	0,024	0,202	425721,210
843,462	45884,39	23275,836	41,356	29101,777	5939,441	6385,084	0,088	0,142	677112,913
855,514	46208,03	46930,806	85,820	85067,632	5737,624	14036,251	0,177	0,149	1530466,371
867,561	46529,26	9119,753	15,006	14053,876	5724,235	2436,437	0,034	0,152	132157,286
871,493	46633,63	5908,694	8,996	7031,210	6046,058	1438,897	0,022	0,144	73003,041
901,570	47424,20	4861,946	7,006	4179,641	5296,155	1328,104	0,018	0,170	56892,022
921,604	47943,49	5002,875	7,415	4637,261	877,677	7199,113	0,019	1,050	71677,937
923,545	47993,51	7875,416	12,723	12955,591	6214,272	2081,523	0,030	0,149	113371,518
952,062	48722,20	5820,610	9,865	2428,919	627,113	13053,889	0,022	1,518	284246,811
963,684	49016,05	15716,251	28,011	28735,733	5765,382	5232,972	0,059	0,167	340495,775
981,625	49466,19	5580,183	8,559	11855,676	6798,902	1345,007	0,021	0,144	29898,076
991,722	49717,69	5061,559	7,599	1967,865	4742,926	1728,599	0,019	0,209	130372,106
1009,652	50161,17	5377,176	8,462	10176,689	6516,282	1446,000	0,020	0,155	38336,701
1029,729	50653,09	18659,786	35,438	125079,140	7997,365	4911,805	0,070	0,129	91992,554
1051,701	51185,98	127013,459	257,122	192479,715	6933,297	43503,553	0,479	0,152	6023529,883
1057,762	51331,97	5427,943	8,788	8764,571	7052,917	1450,610	0,020	0,150	47658,508
1065,717	51522,98	4753,033	7,427	2328,725	5716,893	1551,746	0,018	0,186	115954,911
1067,687	51570,16	11371,161	20,994	28419,395	6872,687	3575,021	0,043	0,155	150094,189
1079,739	51857,91	33172,051	65,911	77898,831	6813,592	11717,560	0,125	0,158	833454,411
1095,717	52236,92	5926,663	9,871	11020,113	7593,226	1596,689	0,022	0,144	51022,422
1105,761	52473,74	7839,069	13,922	1808,693	6436,058	2680,023	0,030	0,172	988805,324
1125,795	52942,92	15228,749	29,373	81470,451	8322,557	4384,257	0,057	0,135	107153,514
1139,681	53265,66	4979,949	7,961	4271,194	5997,853	1763,568	0,019	0,190	82197,083
1147,768	53452,73	30433,057	62,133	90936,929	8300,889	9657,408	0,115	0,138	511773,680
1153,848	53592,92	6925,320	12,172	1907,675	3416,339	4535,435	0,026	0,338	364214,606

1175,800	54096,05	13106,803	25,735	31364,345	7670,947	4466,980	0,049	0,153	233223,297
1319,936	57288,66	25378,918	57,866	38060,813	8702,709	9544,555	0,096	0,152	978695,947
1335,890	57631,04	3886,822	6,628	3354,837	6343,725	1550,037	0,015	0,211	47145,080
1341,923	57760,00	40708,729	95,560	152691,333	8820,879	16043,052	0,153	0,152	766195,540
1347,965	57888,83	11771,145	25,676	14298,828	7238,622	5246,511	0,044	0,186	479145,925
1357,915	58100,38	3864,720	6,504	2593,418	9084,179	1047,353	0,015	0,149	49368,875
1363,907	58227,39	68041,930	163,035	164772,910	7244,634	34782,977	0,256	0,188	2897076,156
1369,962	58355,47	16289,137	36,462	73656,257	8303,886	6708,408	0,061	0,165	211113,121
1379,895	58564,96	7465,616	14,974	9665,852	5898,893	3979,919	0,028	0,234	184850,820
1390,546	58788,74	14222,089	31,693	1283,668	3359,825	12968,542	0,054	0,414	3374068,047
1391,954	58818,25	23205,396	53,822	14591,818	4562,928	18111,776	0,087	0,305	3344245,070
1418,584	59373,77	4679,218	8,608	2587,687	1608,712	8195,680	0,018	0,882	150280,911
1419,983	59402,81	4220,444	7,151	698,021	15708,415	659,792	0,016	0,090	78219,384
1455,959	60144,67	8530,847	18,776	22862,311	7524,225	4154,742	0,032	0,194	148262,829
1484,006	60716,68	3782,651	6,785	752,029	4442,546	2439,387	0,014	0,334	133895,626
1543,977	61921,85	24763,994	63,391	47102,201	8231,701	13587,110	0,093	0,188	1084770,028
1572,036	62477,65	7714,073	17,785	4167,027	5343,682	5610,780	0,029	0,294	643601,472
1631,998	63648,95	20164,212	54,578	63165,100	8579,734	11594,127	0,076	0,190	601917,189
1660,036	64189,24	7037,897	17,111	13209,580	6335,340	5008,161	0,027	0,262	153624,692
1768,207	66231,96	8202,953	22,160	17336,559	6981,751	6297,611	0,031	0,253	238968,441
1796,245	66751,14	4061,210	9,419	3633,058	5999,751	3126,866	0,015	0,299	88458,286
1856,215	67848,10	12003,892	35,627	48832,332	8559,529	8768,632	0,045	0,217	283821,428
1884,254	68354,89	5456,872	15,033	11013,626	6434,445	4759,082	0,021	0,293	99151,894
2080,396	71799,09	10501,021	40,558	35692,228	8389,157	8995,541	0,040	0,248	300224,850
2108,436	72277,92	6043,683	22,499	8367,755	6951,062	5794,005	0,023	0,303	248710,730
2152,429	73022,79	2286,003	6,419	876,029	6567,799	1696,676	0,009	0,328	57422,160
2168,405	73291,39	13939,470	60,475	46728,445	8971,450	11989,752	0,053	0,242	493656,291
2182,430	73526,38	2553,523	7,669	773,067	6354,886	2067,154	0,010	0,343	91470,456
2196,442	73760,41	7960,019	33,890	14532,870	7412,900	7899,584	0,030	0,296	289354,365
2224,462	74226,13	2380,124	7,251	1409,593	5362,946	2228,313	0,009	0,415	46339,972
2392,631	76961,53	4620,625	23,709	11217,028	7703,400	4746,860	0,017	0,311	92596,880
2420,660	77407,94	3291,441	16,110	4430,245	7150,388	3426,010	0,012	0,339	51783,560
2682,817	81463,89	1328,403	6,221	1618,637	8952,617	895,758	0,005	0,300	10293,872
2688,825	81554,45	1281,553	6,190	1547,741	5673,978	1351,277	0,005	0,474	15279,461
2704,804	81794,83	2891,572	20,794	4064,295	7501,219	3553,304	0,011	0,361	51366,531
2732,806	82214,36	2319,023	16,266	3630,970	7026,967	2955,266	0,009	0,389	41288,020

m/z	time	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.	FWHM	Chi^2
717,480	42351,32	44956,131	66,753	68937,611	6814,883	8630,517	0,120	0,105	577458,094
732,414	42785,61	6289,750	8,112	755,174	1769,389	3638,656	0,017	0,414	472443,441
739,462	42989,01	373870,197	575,463	115667,532	4829,546	109373,383	1,000	0,153	72921282,313
745,518	43163,01	12047,132	16,759	3023,692	5735,884	2652,768	0,032	0,130	550636,786
753,484	43390,82	31790,875	47,540	33639,623	5617,917	7747,372	0,085	0,134	825461,173
755,438	43446,50	34198,475	51,263	31018,498	5607,786	8499,195	0,091	0,135	1104075,032
761,488	43618,51	65255,890	100,285	71591,558	6240,828	14926,510	0,175	0,122	1765373,637
767,502	43788,78	120151,099	187,228	125938,766	5349,628	32649,157	0,321	0,143	5321875,593
772,764	43937,22	8739,909	11,855	3208,746	2078,674	4950,990	0,023	0,372	185936,585
775,504	44014,29	7925,403	10,549	5085,995	5398,373	1804,783	0,021	0,144	59230,656
777,469	44069,52	6390,319	8,136	578,919	5201,856	1498,889	0,017	0,149	327209,851
783,467	44237,58	10001,408	13,941	2181,849	5282,518	2520,756	0,027	0,148	574812,303
789,521	44406,56	30698,223	46,965	30000,804	6142,722	7305,919	0,082	0,129	824550,592
800,709	44717,15	5073,126	6,165	1195,817	1847,151	2909,073	0,014	0,433	144035,843
805,494	44849,33	55399,575	86,996	65706,168	7015,037	12083,273	0,148	0,115	1240599,331
813,459	45068,47	5600,970	7,076	1871,093	4288,657	1698,850	0,015	0,190	77336,293
819,515	45234,36	5198,181	6,462	312,081	4721,936	1338,548	0,014	0,174	439064,564
827,472	45451,38	330211,478	535,470	113680,686	5124,029	108228,398	0,883	0,161	60620722,300
833,530	45615,93	12722,081	18,574	11348,174	6241,901	3069,309	0,034	0,134	200129,952
839,566	45779,27	6246,628	8,034	401,493	2791,661	2906,154	0,017	0,301	540587,587
841,493	45831,30	26540,143	41,251	17306,490	5376,213	8143,352	0,071	0,157	1314565,702
843,454	45884,18	32906,520	51,879	25922,900	5808,969	9385,620	0,088	0,145	1386700,938
855,509	46207,90	92562,543	150,323	94657,900	5446,170	29616,360	0,248	0,157	5145575,036
867,567	46529,44	6046,694	7,801	472,129	4084,320	2041,229	0,016	0,212	341191,343
871,484	46633,40	9060,617	12,818	3211,720	6100,032	2304,401	0,024	0,143	247300,113
901,558	47423,90	68892,262	113,706	132079,322	7449,732	16749,687	0,184	0,121	1144712,911
915,573	47787,78	10310,418	15,361	7563,111	6919,304	2445,343	0,028	0,132	139104,949
923,543	47993,44	125863,187	211,295	113712,236	6629,707	36418,438	0,337	0,139	6859474,821
929,593	48148,97	36176,091	59,295	118098,604	7195,342	9339,093	0,097	0,129	330248,773
937,561	48353,05	17479,253	27,552	27257,958	6364,064	5051,081	0,047	0,147	269174,698
939,518	48403,03	8325,160	11,985	1095,098	5896,530	2400,873	0,022	0,159	563060,076
951,577	48709,90	68208,143	114,290	160627,118	6348,498	21541,634	0,182	0,150	1696935,024
964,584	49038,73	4892,564	6,197	781,390	3399,837	2243,765	0,013	0,284	174509,776
967,552	49113,46	5150,449	6,645	960,416	6039,937	1353,392	0,014	0,160	105894,477
1029,709	50652,61	6458,316	9,844	3606,994	6937,323	1705,391	0,017	0,148	51995,020
1051,699	51185,92	31237,407	56,573	94837,020	6679,986	10660,010	0,084	0,157	462664,475
1079,732	51857,75	8867,896	14,898	9706,638	6214,081	3119,054	0,024	0,174	116360,107
1105,761	52473,74	9803,955	16,916	8281,251	6044,790	3692,665	0,026	0,183	195355,941
1125,782	52942,62	8069,201	13,595	4675,200	7587,180	2335,054	0,022	0,148	128682,564
1147,770	53452,77	15105,447	28,167	39772,008	7260,481	5212,942	0,040	0,158	159814,158
1153,826	53592,40	4636,859	6,792	699,960	3996,656	2261,553	0,012	0,289	165245,513

Table S5. List of MALDI-TOF MS mass peaks for cellular lipid extract of *C. acnes* DSM 16379 strain. Yellow lines have been removed from the analysis as medium contamination.

1175,799	54096,03	8516,517	15,055	9362,035	6643,455	3139,141	0,023	0,177	115838,330
1319,922	57288,36	6092,970	11,760	2619,863	7010,897	2407,060	0,016	0,188	100528,361
1341,909	57759,69	10401,292	22,248	45177,501	7844,455	4221,089	0,028	0,171	65615,595
1363,898	58227,21	17967,769	41,016	42339,412	6645,926	9565,312	0,048	0,205	372234,334
1369,935	58354,89	5492,829	10,579	4666,627	7285,931	2241,971	0,015	0,188	53476,852
1377,916	58523,28	4756,955	8,833	519,359	5318,576	2583,897	0,013	0,259	316505,855
1390,534	58788,50	4148,214	7,403	446,050	2761,183	3556,846	0,011	0,504	357985,500
1391,945	58818,06	7881,382	16,645	2085,866	4314,374	5896,795	0,021	0,323	355742,056
1455,948	60144,45	14221,556	34,248	39632,281	7308,904	7512,501	0,038	0,199	249076,779
1469,953	60430,76	3541,957	6,185	966,585	6951,078	1417,854	0,009	0,211	67876,184
1477,980	60594,25	3936,700	7,167	1320,700	7217,636	1604,437	0,011	0,205	63490,656
1483,983	60716,22	7686,361	17,292	4032,474	5744,022	4894,588	0,021	0,258	185660,743
1543,965	61921,62	35122,297	95,859	106796,134	7168,500	22420,964	0,094	0,215	1020063,303
1557,983	62199,90	6989,723	16,075	2049,274	6482,500	4179,562	0,019	0,240	347123,344
1566,009	62358,68	4257,354	8,296	1988,557	5224,968	2688,341	0,011	0,300	68258,602
1572,006	62477,05	17418,550	46,266	14127,166	5987,366	13155,711	0,047	0,263	808756,208
1631,988	63648,76	24836,471	71,420	59422,257	7482,484	16563,094	0,066	0,218	778504,150
1640,050	63804,59	4436,353	9,173	1750,957	5240,110	3015,729	0,012	0,313	84515,516
1646,009	63919,52	5418,908	12,239	997,100	6549,911	3230,866	0,014	0,251	235771,622
1660,027	64189,07	12180,790	33,481	12119,154	6251,162	9436,992	0,033	0,266	335432,822
1668,081	64343,42	3753,263	7,194	1331,024	4884,056	2603,081	0,010	0,342	77675,673
1728,077	65481,66	4986,155	11,943	2967,459	5486,032	3900,105	0,013	0,315	82808,902
1756,099	66006,49	4435,589	10,358	5596,184	5421,786	3547,518	0,012	0,324	38548,003
1768,207	66231,95	3095,643	6,460	1446,543	3879,926	2973,328	0,008	0,456	66733,568
1856,205	67847,92	3506,354	8,889	3957,539	7001,367	2380,287	0,009	0,265	27822,991
2080,381	71798,84	3662,186	13,530	4212,150	7384,606	3016,324	0,010	0,282	41774,955
2108,410	72277,48	2868,921	10,191	3103,326	6532,807	2508,003	0,008	0,323	33281,785
2168,397	73291,27	4575,567	19,952	4634,208	7524,259	4139,364	0,012	0,288	70532,095
2182,417	73526,16	1985,049	6,489	1250,809	6110,613	1613,944	0,005	0,357	32238,370
2196,428	73760,16	3731,660	16,209	3377,392	6738,427	3671,155	0,010	0,326	64316,171
2348,458	76252,61	2158,972	9,202	2876,290	6429,066	1985,565	0,006	0,365	20731,626
2376,485	76703,18	1768,352	7,169	1845,376	5187,510	1819,107	0,005	0,458	21764,043

m/z	time	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.	FWHM	Chi^2
707,369	42054,71	16490,297	27,874	5718,758	4683,360	4501,008	0,054	0,151	700325,247
711,433	42174,20	8796,179	14,160	3805,666	5113,000	2042,784	0,029	0,139	93561,264
717,487	42351,54	43315,366	76,486	41680,400	6734,846	8363,335	0,141	0,107	635608,698
732,399	42785,18	4391,509	6,038	886,659	1292,176	3239,320	0,014	0,567	181517,794
735,396	42871,77	5149,537	7,446	614,048	4895,417	1190,936	0,017	0,150	172650,564
739,459	42988,93	307217,078	563,622	76404,332	5263,389	81983,488	1,000	0,140	61085101,550
745,519	43163,04	9654,535	15,563	3806,004	6637,395	1775,796	0,031	0,112	97824,901
751,399	43331,32	12218,052	20,317	3379,280	5705,612	2783,961	0,040	0,132	360449,679
753,474	43390,54	11846,563	19,648	999,546	5897,182	2619,649	0,039	0,128	1016986,766
755,435	43446,43	53392,897	96,913	38347,019	6110,405	12374,620	0,174	0,124	1882443,672
761,488	43618,49	5230,411	7,449	1236,954	6345,887	913,545	0,017	0,120	68298,866
767,492	43788,48	74325,909	136,811	77728,879	5980,765	18059,878	0,242	0,128	2492556,620
772,771	43937,40	6233,569	9,390	974,279	1499,126	4617,306	0,020	0,515	351182,341
783,462	44237,45	12313,898	20,937	4757,835	5984,131	2840,860	0,040	0,131	247057,701
795,422	44570,66	9944,045	16,675	1804,966	4195,208	3340,899	0,032	0,190	287412,336
799,436	44681,92	5348,073	7,953	213,833	5260,045	1254,368	0,017	0,152	550296,344
805,497	44849,40	45891,597	85,788	37383,672	7464,882	9373,095	0,149	0,108	962464,290
825,303	45392,33	5323,769	7,720	7,029	3431,663	2035,070	0,017	0,240	27982770,589
827,473	45451,42	293091,232	566,747	88689,881	5488,939	88517,045	0,954	0,151	55174813,596
833,532	45615,99	13940,815	24,541	15750,801	6752,244	3100,481	0,045	0,123	107590,082
839,456	45776,32	7175,856	11,375	1206,412	3929,918	2562,436	0,023	0,214	214030,404
841,490	45831,21	12246,955	21,305	1110,182	5208,259	3591,380	0,040	0,162	1626341,920
843,450	45884,08	55878,298	106,484	38782,892	6247,641	14950,262	0,182	0,135	2648660,704
855,507	46207,84	95108,577	184,182	92380,352	6065,579	27073,672	0,310	0,141	4471989,067
859,464	46313,62	5096,313	7,380	1004,239	2883,166	2286,073	0,017	0,298	128752,642
867,537	46528,62	4873,809	6,971	1147,878	3652,324	1696,642	0,016	0,238	84310,665
871,481	46633,30	17305,373	31,473	12472,579	6315,694	4582,768	0,056	0,138	371819,829
883,499	46950,84	6603,626	10,575	910,893	3867,364	2506,178	0,021	0,228	236613,385
901,560	47423,95	62074,883	121,948	96502,611	7692,308	14474,694	0,202	0,117	979500,674
923,540	47993,36	86773,828	172,613	121773,067	6872,009	24079,556	0,282	0,134	2682914,050
929,594	48149,01	21136,716	40,178	51778,685	7356,517	5162,490	0,069	0,126	132911,609
937,556	48352,93	4421,375	6,315	708,187	6449,857	974,379	0,014	0,145	90274,943
939,521	48403,10	11228,725	20,128	6332,712	6320,777	3140,857	0,037	0,149	187419,811
942,586	48481,30	8576,365	14,763	2633,430	6123,108	2370,592	0,028	0,154	142621,483
951,572	48709,78	30872,644	60,464	35194,799	6328,871	9603,550	0,100	0,150	922838,157
963,675	49015,83	4502,466	6,568	393,065	6647,504	1007,342	0,015	0,145	181505,412
964,573	49038,45	11687,350	21,342	9257,630	5605,584	3926,816	0,038	0,172	170787,406
967,553	49113,48	5054,360	7,707	888,849	5513,453	1431,236	0,016	0,175	121472,768
1023,647	50504,60	5855,907	9,975	1589,935	5720,599	1816,556	0,019	0,179	100825,127
1029,715	50652,76	8564,112	15,920	9627,184	7904,820	2062,686	0,028	0,130	37698,549
1051,696	51185,85	45085,447	97,200	97199,585	7347,142	14172,840	0,147	0,143	952479,642

Table S6. List of MALDI-TOF MS mass peaks for cellular lipid extract of *C. acnes* PCM 2334 strain. Green and yellow lines have been removed from the analysis as matrix and medium contamination.

10.57.574		0001.011	15 001	5 4 5 0 4 5 0	50 1 0 5 0 1		0.000	0.154	0.51.61.41.0
1067,674	51569,87	8901,344	17,201	5450,478	6842,704	2698,024	0,029	0,156	85161,412
1079,729	51857,68	5328,793	9,363	1633,557	6697,789	1540,628	0,017	0,161	77983,348
1105,763	52473,78	4790,758	8,146	833,517	4682,300	1928,089	0,016	0,236	132301,510
1125,783	52942,64	13117,420	27,623	26514,163	8663,606	3516,861	0,043	0,130	68819,562
1147,765	53452,65	20630,235	45,879	42274,832	7616,449	6958,406	0,067	0,151	299670,224
1175,799	54096,02	3908,867	6,222	668,373	4559,868	1527,752	0,013	0,258	93479,605
1319,926	57288,45	4471,025	8,918	2089,588	8386,560	1259,386	0,015	0,157	42788,515
1341,904	57759,58	9398,951	22,836	15372,154	9272,044	3206,801	0,031	0,145	84334,092
1363,895	58227,14	12107,030	30,701	16620,856	7678,600	5321,607	0,039	0,178	193245,332
1379,869	58564,40	3858,690	7,533	1530,160	6568,645	1548,420	0,013	0,210	46853,523
1455,940	60144,28	15191,259	42,143	45440,745	9291,147	6386,628	0,049	0,157	188330,513
1483,970	60715,96	7448,470	19,208	6010,799	8289,182	3311,044	0,024	0,179	94600,015
1543,957	61921,45	39077,177	122,005	125771,419	9598,620	18619,239	0,127	0,161	998682,755
1557,973	62199,70	4312,767	9,735	1191,602	8126,883	1787,504	0,014	0,192	87460,505
1559,943	62238,71	4517,674	10,414	1210,695	7706,418	2003,049	0,015	0,202	99936,954
1571,990	62476,74	20004,463	61,288	32330,143	8812,405	10460,893	0,065	0,178	591319,658
1587,969	62791,03	3395,682	6,899	1333,139	7200,231	1443,800	0,011	0,221	40884,096
1600,038	63027,38	3676,955	7,923	791,313	5419,759	2169,606	0,012	0,295	124843,889
1631,977	63648,54	27308,229	89,310	124075,402	10028,319	13657,442	0,089	0,163	460932,544
1640,060	63804,77	3745,675	8,172	608,068	5132,954	2293,390	0,012	0,320	138872,955
1646,003	63919,41	3475,582	7,256	1180,051	6929,230	1613,764	0,011	0,238	52257,456
1647,967	63957,23	4053,797	9,275	1634,263	7767,205	1847,096	0,013	0,212	56249,249
1660,013	64188,79	17189,693	55,757	27763,222	9126,578	9493,643	0,056	0,182	478294,946
1688,047	64724,45	3781,097	8,563	1597,921	8169,875	1637,014	0,012	0,207	47621,204
1728,067	65481,46	4260,282	10,746	2027,682	5683,998	2985,295	0,014	0,304	76307,576
1756,096	66006,42	3401,929	7,697	3089,584	6355,449	1983,495	0,011	0,276	25533,316
1768,182	66231,50	5168,141	14,635	2301,366	8016,511	2960,535	0,017	0,221	94851,615
1856,196	67847,76	6605,751	21,950	9200,004	9701,929	3832,656	0,022	0,191	77067,653
1884,229	68354,43	3258,354	8,917	2855,826	8727,658	1719,222	0,011	0,216	26162,373
2080,375	71798,72	3290,910	12,782	3363,552	8556,659	2240,597	0,011	0,243	34194,721
2168,384	73291,05	4272,656	20,077	2947,220	9439,219	3050,270	0,014	0,230	77917,658
2196,429	73760,17	2477,129	10,099	1630,359	7567,274	1837,998	0,008	0,290	39476,627
2260,438	74819,79	2020,151	8,006	1130,380	7356,823	1459,265	0,007	0,307	33628,738
2348,457	76252,60	2180,340	10,373	2101,270	6595,380	1980,233	0,007	0,356	28731,379
2376,494	76703,31	1975,022	9,201	1692,652	6483,677	1738,356	0,006	0,367	26871,336
2436,466	77658,56	1513,468	6,522	2037,206	7476,048	1051,919	0,005	0,326	9654,383
2464,492	78100,90	1471,556	6,388	1688,785	7944,529	957,463	0,005	0,310	10069,335

List of MALDI-TOF MS mass peaks of culture medium

Table S7. List of MALDI-TOF mass peaks of culture medium used for *C. acnes* cultivation - thioglycollate-soy broth (TS).

m/z	time	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.	FWHM	Chi^2
711,400	42173,21	5895,899	10,160	1434,793	7227,609	962,175	0,041	0,098	112881,501
733,382	42813,59	4979,054	8,424	1678,425	7305,451	822,477	0,035	0,100	68174,208
760,846	43600,28	3896,066	6,450	1875,371	7932,104	639,650	0,027	0,096	32079,231
838,424	45748,41	4025,972	6,357	2749,994	7376,511	781,373	0,028	0,114	25793,460
843,394	45882,57	6395,173	10,367	2330,654	6894,298	1408,550	0,045	0,122	103016,830
860,409	46338,84	19582,853	32,642	38133,217	7878,912	3986,069	0,137	0,109	102508,143
865,437	46472,80	20773,579	34,599	37916,610	7433,242	4438,285	0,145	0,116	140165,980
867,454	46526,42	7836,228	12,694	4110,087	8248,040	1509,728	0,055	0,105	70996,065
876,384	46763,12	5333,059	8,401	2103,617	7483,293	1154,055	0,037	0,117	67925,989
881,410	46895,79	6739,184	10,690	250,867	7737,191	1393,555	0,047	0,114	988672,195
882,399	46921,86	28104,473	46,622	19191,921	7367,165	6428,297	0,196	0,120	1063451,518
889,468	47107,72	9346,775	15,023	13868,059	7235,269	2105,318	0,065	0,123	33843,456
898,372	47340,79	12009,400	19,463	6153,021	7080,546	2961,417	0,084	0,127	126783,295
911,446	47680,92	143361,087	238,375	116364,179	7368,268	34782,882	1,000	0,124	9144060,241
927,423	48093,25	42507,686	70,005	112401,349	7845,870	9832,188	0,297	0,118	460837,320
933,433	48247,44	125315,449	207,560	107244,026	7109,962	32824,820	0,874	0,131	7721369,223
949,412	48654,96	60134,661	98,808	98453,419	7620,871	14888,343	0,419	0,125	1489249,330
965,385	49058,91	5999,444	9,079	1146,436	5395,933	2208,142	0,042	0,179	199706,557
982,508	49488,22	6658,393	10,181	2184,141	7706,603	1545,226	0,046	0,127	111347,186
987,538	49613,62	8452,453	13,159	5127,279	8091,468	1924,601	0,059	0,122	86013,391
1004,498	50034,10	4286,370	6,262	226,103	7084,415	1091,524	0,030	0,142	443770,060
1009,525	50158,06	5164,482	7,713	157,170	7210,130	1337,923	0,036	0,140	971181,683
1024,531	50526,22	6851,250	10,413	958,024	7298,323	1807,610	0,048	0,140	292329,245
1027,510	50598,98	4570,006	6,661	263,869	7318,294	1143,925	0,032	0,140	457579,989
1033,525	50745,58	6607,376	9,955	490,186	7433,880	1715,407	0,046	0,139	555562,942
1046,523	51060,90	7275,432	11,017	2459,246	7628,100	1900,856	0,051	0,137	127684,854
1062,498	51445,78	4299,074	6,153	575,830	6658,374	1376,499	0,030	0,160	185744,704
1073,516	51709,54	11502,873	17,975	6049,356	7804,268	3224,811	0,080	0,138	192785,040
1089,520	52090,26	5578,500	8,272	493,451	7009,129	1669,145	0,039	0,155	402358,192
1095,514	52232,12	7093,830	10,743	1672,970	7094,595	2224,536	0,049	0,154	195841,767
1105,539	52468,53	12913,466	20,269	4063,476	7969,398	3709,495	0,090	0,139	455491,843
1111,519	52609,03	4304,999	6,180	649,063	5789,987	1636,823	0,030	0,192	187413,407
1122,560	52867,45	32694,837	52,913	63025,491	8000,120	9843,736	0,228	0,140	418706,880
1127,531	52983,38	8986,971	13,909	2745,777	7735,504	2715,076	0,063	0,146	200682,076
1138,545	53239,34	9600,982	14,928	2686,591	7706,539	2968,660	0,067	0,148	215032,429
1144,550	53378,37	58270,714	95,364	23535,541	7316,625	20487,220	0,406	0,156	2320535,087
1160,532	53746,62	23116,078	37,478	6689,882	7301,416	8258,094	0,161	0,159	590820,495
1257,647	55931,58	5617,918	8,886	1067,214	8097,053	1868,204	0,039	0,155	209444,147
1284,639	56523,71	4365,436	6,829	871,436	8233,252	1432,698	0,030	0,156	147159,067
1306,630	57001,51	5001,255	8,128	1409,227	7234,138	2079,242	0,035	0,181	135041,712

1385,711	58687,26	6508,172	11,598	4993,162	8538,049	2485,164	0,045	0,162	65612,358
1401,698	59022,13	3654,622	6,254	852,856	8149,401	1470,502	0,025	0,172	121474,677
1986,028	70163,34	1917,093	8,807	3607,096	9104,308	1215,252	0,013	0,218	13012,040

List of MALDI-TOF MS mass peaks of norharmane matrix

m/z	time	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.	FWHM	Chi^2
704,323	41964,96	3091,291	10,287	442,354	3245,918	1247,570	0,099	0,217	152038,434
707,394	42055,46	2229,978	7,425	353,553	1727,743	1722,007	0,072	0,409	174145,978
712,164	42195,65	3248,755	10,841	669,599	3404,233	1311,067	0,105	0,209	119394,238
715.055	42280.38	1939.669	6.480	504,103	2808.828	985,905	0.062	0.255	70748.476
737.267	42925.76	6234.696	20.972	2895.733	4372.003	2040.564	0.201	0.169	83924.308
779.228	44118.88	3239.626	11.096	1174.869	3431.275	1485.503	0.104	0.227	74549.634
802.347	44762.45	2618.820	9.072	609.207	5990.646	694.667	0.084	0.134	66178,799
803.355	44790.29	11642.515	40.322	30613.840	5581.332	3223,162	0.375	0.144	63947.377
810 220	44979 48	2376 488	8 257	725 711	5165 179	739 564	0.076	0.157	50046 214
823 235	45335.97	3108 973	10.869	106 245	2822 835	1895.019	0,100	0.292	1264209 697
825,330	45393,07	31081,363	108,681	110142,313	5400,757	9483,886	1,000	0,153	337147,920

 Table S8. List of MALDI-TOF mass peaks of norharmane matrix.

MALDI-TOF MS lipid profiles of culture medium and matrix



Figure S3. Positive ion MALDI-TOF MS spectra of lipid extract of culture medium used for *C. acnes* cultivation - thioglycollate-soy broth (a), and norharmane matrix (b).





Comprehensive lipidomic analysis of the genus Cutibacterium

Anna Chudzik,¹ Mariusz A. Bromke,² Andrzej Gamian,¹ Mariola Paściak¹

AUTHOR AFFILIATIONS See affiliation list on p. 15.

ABSTRACT Cutibacterium are part of the human skin microbiota and are opportunistic microorganisms that become pathogenic in immunodeficient states. These lipophilic bacteria willingly inhabit areas of the skin where sebaceous glands are abundant; hence, there is a need to thoroughly understand their metabolism. Lipids are no longer considered only structural elements but also serve as signaling molecules and may have antigenic properties. Lipidomics remains a major research challenge, mainly due to the diverse physicochemical properties of lipids. Therefore, this study aimed to perform a large comparative lipidomic analysis of eight representatives of the Cutibacterium genus, including four phylotypes of C. acnes and two strains of C. granulosum, C. avidum, and C. namnetense. Lipidomic analysis was performed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in both positive and negative ion modes, allowing the detection of the widest range of metabolites. Fatty acid analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) corroborated the lipidomic data. As a result, 128 lipids were identified, among which it was possible to select marker compounds, some of which were characteristic even of individual C. acnes phylotypes. These include phosphatidylcholine PC 30:0, sphingomyelins (SM 33:1, SM 35:1), and phosphatidylglycerol with an alkyl ether substituent PG O-32:0. Moreover, cardiolipins and fatty acid amides were identified in Cutibacterium spp. for the first time. This comparative characterization of the cutibacterial lipidome with the search for specific molecular markers reveals its diagnostic potential for clinical microbiology.

IMPORTANCE *Cutibacterium* (previously *Propionibacterium*) represents an important part of the human skin microbiota, and its role in clinical microbiology is growing due to opportunistic infections. Lipidomics, apart from protein profiling, has the potential to prove to be a useful tool for defining the cellular fingerprint, allowing for precise differentiation of microorganisms. In this work, we presented a comparative analysis of lipids found in eight strains of the genus *Cutibacterium*, including a few *C. acnes* phylotypes. Our results are one of the first large-scale comprehensive studies regarding the bacterial lipidome, which also enabled the selection of *C. acnes* phylotype-specific lipid markers. The increased role of lipids not only as structural components but also as diagnostic tools for clinical antigens has led to new lipid markers that can be used as diagnostic tools for clinical microbiology. We believe that the findings in our paper will appeal to a wide range of researchers.

KEYWORDS lipidomics, lipids, fatty acids, UPLC-MS, cutibacteria, *Propionibacterium*, diagnostic markers

C utibacterium (formerly Propionibacterium) is a commonly occurring microbiota that is widely distributed on human skin, and its characteristic ability is the production of propionic acid. These Gram-positive, anaerobic bacteria are opportunistic microorganisms that become pathogenic in states of immunodeficiency (1, 2). Numerous reports indicate the important role of *C. acnes* in the pathogenesis of not only frequent skin diseases such as acne but also the ability to create biofilms on the surface of implants **Editor** Lifeng Zhu, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China

Address correspondence to Mariola Paściak, mariola.pasciak@hirszfeld.pl.

Anna Chudzik and Mariusz A. Bromke contributed equally to this article. The author order was determined in order of increasing seniority.

The authors declare no conflict of interest.

Received 25 January 2024 **Accepted** 12 April 2024 **Published** 7 May 2024

Copyright © 2024 Chudzik et al. This is an openaccess article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license. and catheters (3, 4). There are several substrains of *C. acnes* classified into three major genetic lineages, types I, II, and III; some are found in healthy skin (types II and III), and some are associated with diseases, including acne (type IA1) (5, 6). Other cutibacteria are rarely found in opportunistic infections, and *C. avidum* and *C. granulosum* have been described as the causes of soft tissue and medical device-related infections (7). In addition, *C. namnetense* was isolated from surgical samples of human bone infection (8); *C. avidum* was isolated from chronically infected sinuses, ulcers, and abscesses, often in combination with other organisms, but separate cases have also been published (9, 10).

As lipophilic microorganisms, cutibacteria willingly inhabit areas of the skin where sebaceous glands are abundant. The products of their metabolism are proinflammatory factors; hence, there is a need to thoroughly understand the metabolism and structural lipids of these bacteria.

Bacterial lipids share a common backbone composed most often of glycerol, less often of sphingosine, skeletal modifying compounds (choline, ethanolamine, or sugars), and fatty acids. They are the structural components of bacterial cells, and due to the extremely important role of lipids in maintaining the proper functioning of the cell, lipids ensure the durability of their envelope and adaptation to external conditions; lipids also act as energy stores and participate in signal transduction and cell recognition (11). Their composition is a specific fingerprint for individual strains that enable the detection of differences even between phylotypes of the same species (12). In addition to proteomics and genomics, lipidomics has become a tool that allows for a thorough understanding of microbial metabolism (13). In recent years, it has also been proven that lipids exhibit antigenic properties through their ability to stimulate T lymphocytes. Among antigen-presenting cells, CD1a, CD1b, CD1c, and CD1d are involved in the presentation of lipid antigens, including glycolipids of bacterial origin (14, 15). These processes participate in the immune response against microorganisms, which leads to the release of proinflammatory cytokines (16, 17) and may cause pathological changes in the skin or other tissues colonized by bacteria of the genus Cutibacterium (18). Hence, the comparative analysis of bacterial lipidomes (profiles of various cellular lipids) increases the understanding of the cellular metabolism occurring in these bacteria but also provides an important basis for determining their interaction with human cells in the future.

This study aimed to obtain broad, untargeted insight into the bacterial lipidome, both in terms of identification and their composition in individual strains, as well as to identify fatty acids with their quantitative composition.

Currently, the leading method in lipid separation and analysis is liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Due to the large variety of properties resulting from the chemical structure and quantitative differences, the analysis of complete bacterial lipidomes is still challenging. These properties are substantial and range from amphiphilic glycerophospholipids through nonpolar glycerolipids to nonionic ceramides (13). Therefore, the identification of lipid compounds based on the combination of high-performance liquid chromatography with tandem MS, which precisely determines the mass and fragmentation data, is an appropriate approach.

Particularly noteworthy in the lipidomic analysis are fatty acids, hydrophobic components of membranes, and a key determinant differentiating lipid structures in bacteria. Therefore, they are good and reliable targets for comparing and characterizing individual microorganisms (19, 20).

Despite the dynamic development of research focused on bacterial lipidomics, comparative lipidomic analyses that allow the compilation of the properties of individual species within the genus, and even within the phylotypes of the same species, are rare. The following work presents for the first time a comparative analysis of lipids and fatty acids obtained from eight different strains of the genus *Cutibacterium:* four strains belonging to *C. acnes* (phylotypes IA1, IB, II, and III), two strains of *C. granulosum* and one strain each of *C. avidum* and *C. namnetense*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

Type strains of *Cutibacterium* spp. were obtained from Polish Collection of Microorganisms (PDM), German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSM), and National Collection of Type Cultures (NCTC; United Kingdom). The origins of the strains are summarized in Table 1.

Growth conditions

All *C. acnes* strains were cultivated in thioglycollate-soy broth (TS, Thioglycollate medium, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) and trypticasein soy broth (Biomaxima, Lublin, Poland) (1:1, vol/vol) under anaerobic conditions (GasPack systems) at 37°C. After thawing from stock solutions stored at -80°C, individual strains were suspended in 5 mL of TS media. To standardize the number of cells subjected to further extraction procedures, the optical density of all cultured strains was measured at a wavelength of 600 nm (OD₆₀₀) at regular time intervals, which allowed us to construct growth curves. The OD₆₀₀ was measured for each strain until a value of 0.64–1.61 was obtained (Table 2), and the incubation time ranged from 48 h to 72 h. This made it possible to capture all the tested microorganisms in the logarithmic growth phase, which allows for a reliable comparison of their lipidomes. Then, from each bacterial culture, a series of 1 mL samples was drawn: the cells were centrifuged, the supernatant (medium) was discarded, and the samples were frozen at -80°C prior to fatty acid methyl ester (FAME) analysis and lipid extraction.

FAME analysis

Bacterial pellets were freeze-dried and subjected to acidic methanolysis (2 M methanolic HCl solution, 1 h, 80°C) with the addition of 40 μ g C23:0 fatty acid as an internal standard. Then, 1.5 mL of Milli-Q water and 1.5 mL of hexane were added to each sample and extracted. The samples were centrifuged (4,000 rpm, 10 min) to separate the phases. The upper hexane phase was collected in a separate tube, and the aqueous phase was re-extracted by adding 1 mL of hexane. The hexane phases were combined and evaporated under a stream of nitrogen. Prior to analysis, the obtained FAMEs were dissolved in 100 μ L of hexane. The injection volume was 1 μ L. Each sample was injected three times.

Fatty acid analysis was performed using a Focus GC with a Zebron ZB-5HT Phenomenex column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m w/5 m Guardian) combined with an ITQ 700 (Thermo Scientific ITQ Series) mass detector. The carrier gas was helium with a 0.3 mL/min flow rate. The mass range was 50–500 *m/z*, with positive polarity. Separation gradients in gas chromatography were set as follows: starting at 150°C for 4 min and then increasing by 12°C/min to reach 270°C. The raw mass spectrometry data were processed using Thermo Xcalibur software.

For the annotation of FAMEs and comparison between analytes derived from different bacterial strains, the apex retention time of each detected peak was transformed into

Strain no	Strain name	Origin	Туре
DSM 1897	Cutibacterium acnes subsp. acnes	Facial acne, UK (21)	IA1
DSM 16379	Cutibacterium acnes	Contamination of an anaerobic culture (22)	IB
PCM 2334	Cutibacterium acnes subsp. defendens	Cutaneous abscess (23)	Ш
NCTC 13655	Cutibacterium acnes subsp. elongatum	Normal forehead skin, Japan (21)	Ш
PCM 2401	Cutibacterium granulosum	Human acne (24)	-
PCM 2462	Cutibacterium granulosum	Culture contaminant (24)	-
DSM 4901	Cutibacterium avidum	Unknown source (22)	-
DSM 29427	Cutibacterium namnetense	Surgical samples of human hone infection (22)	_

TABLE 1 Cutibacterium strains used in the lipidomic analysis

10.1128/msphere.00054-24 3

mSphere

Research Article

TABLE 2 OD₆₀₀ values of Cutibacterium spp. after cultivation in thioglycollate-soy broth at 37°C

Strain	OD ₆₀₀ value
C. acnes DSM 1897, type IA1	0.805
C. acnes DSM 16379, type IB	0.965
C. acnes PCM 2334, type II	1.41
C. acnes NCTC 13655, type III	1.1
C. avidum DSM 4901	1.3
C. granulosum PCM 2462	1.13
C. granulosum PCM 2401	1.61
C. namnetense DSM 29427	0.64

a pseudoretention index by interpolation between the retention times of the first and last analytes, *iso*-C15:0 and C23:0 fatty acids, respectively. Next, the peak areas were normalized to the area of the internal standard and the OD_{600} of the sample. Bar plots present the mean (n = 3) values of the normalized data. The heatmaps display the median area (n = 3) scaled to the median value of the analyte across the experiment and log2-transformed. The calculations and plotting were performed using Excel and R (packages corto and heatmap.2).

Lipid extraction

The extraction was performed according to a modified method from Bromke et al. (25). Bacterial pellets were extracted using 800 μ L of a cold (-20°C) mixture of methyl-*tert*-butyl-ether:methanol (3:1, vol/vol) with the addition of internal standards [0.1 μ g/mL deuterated phosphatidylcholine (PC36:0-D₇₀) and 0.1 μ g/mL deuterated arachidonic acid (AA-D₅)]. The samples were then sonicated using a cooled (4°C) ultrasonic bath for 10 min. Then, 400 μ L of a mixture of water:methanol (3:1, vol/vol) was added to each of the samples, which led to the formation of two polar and nonpolar liquid phases. The phases were collected separately, dried with a speedvac, and stored at -20°C prior to lipidomic profiling.

Lipidomic analysis

The analysis of the nonpolar phase lipids was performed using a Waters Acquity UPLC system coupled with an Xevo G2 QToF mass spectrometer. The LC conditions were as follows: column CSH C18 reversed-phase column (2.1 × 150 mm, 1.7 µm, Waters); column temp. 60°C; flow rate 300 µL/min; mobile phase A, acetonitrile/water (60:40, vol/vol) with 10 mM ammonium formate and 0.1% formic acid; mobile phase B, isopropanol/acetonitrile (90:10, vol/vol) with 10 mM ammonium formate and 0.1% formic acid; mobile phase B, isopropanol/acetonitrile (90:10, vol/vol) with 10 mM ammonium formate and 0.1% formic acid; injection volume, 2.5 µL. The MS conditions were as follows: acquisition mode, MS^E; ionization mode, ESI positive/negative; capillary voltages, 2 kV (positive) and 1 kV (negative); and source temperature. 120°C. Samples were analyzed in positive and negative ionization modes.

The raw acquired chromatograms were converted to .abf files by the Reifycs Analysis Base File Converter with the default settings for the Waters MS^E files. For peak detection, alignment, annotation, and peak area integration, the .abf files were loaded into MS-DIAL software (ver 4.9.; RIKEN Institute). The output file was further compared to the in-house database of lipids for refined manual annotation of peaks. All annotated peaks were normalized to internal standard areas and OD₆₀₀. Bar plots present the mean (n = 3) values of the normalized data. One-way ANOVA and Tukey's HSD test were performed to detect statistically significant differences between strains. The heatmaps display the median area (n = 3) scaled to the median value of the analyte across the experiment and log2-transformed. The calculations and plotting were performed using Excel and R (packages pcaMethods, corto, and heatmap.2). Loadings and score tables, as well as ordered data presented in heatmaps, are available as research data (see below).

RESULTS

Fatty acid analysis

Comparative analysis of the fatty acid methyl esters of eight representatives of the Cutibacterium genus revealed similar fatty acid profiles. They were composed of varying amounts of C15:0, C16:0, and C17:0 saturated fatty acids, among which the most abundant in all strains was iso-C15:0 methyl-branched fatty acid (iso-C15:0, Fig. 1A). The highest content of fatty acid iso-C15:0 was detected in C. namnetense DSM 29427 (47.12 µg/OD), and moderate levels were detected in C. acnes PCM 2334 (36.04 µg/OD) and DSM 16379 (36.0 µg/OD), while the lowest content was detected in C. avidum DSM 4901 (17.23 µg/OD). Cutibacteria was also rich in anteiso-C15:0 (ranging from 2.32 to 15.21 μ g/OD) and are much less abundant in normal C15:0 (0.97 μ g/OD-3.47 μ g/OD). The next most abundant fatty acid found was iso- and anteiso-C17:0. Due to the lack of chromatographic separation of iso- and anteiso-C17:0 isomers, the content of C17:0 methyl-branched fatty acids is presented as a sum of peak areas (Fig. 1A, 17:0i + ai). C. namnetense DSM 29427 contained the highest content of iso- and anteiso-C17:0 (15.73 µg/OD) fatty acids, whereas C. acnes NCTC 13655 had the lowest (1.32 µg/OD). Normal C17:0 acid was present in lower amounts than its branched isomers, ranging from 0.48 µg/OD to 1.94 µg/OD. Iso- and anteiso-C16:0 fatty acids were, compared to C15:0 and C17:0, the least abundant. Straight chain nC16:0 fatty acid was detected in all analyzed samples, and its contents were comparable to those of nC17:0, ranging from 0.37 µg/OD in C. granulosum PCM 2401 to 2.07 µg/OD in C. acnes DSM 16379.

Using Euclidean distance-based clustering analysis on log2-transformed ratios, it was possible to distinguish three main clusters of *Cutibacterium* spp. according to their fatty acid profiles (Fig. 1B). The first cluster included two strains of *C. acnes* (DSM 1897 and NCTC 13655), *C. granulosum* PCM 2401 and *C. avidum* DSM 4901. For most of the



FIG 1 Fatty acid content in *Cutibacterium* spp. (A) Bar graph of the quantitative fatty acid content. Individual fatty acids are marked in color: 15i—*iso*-C15:0 methyl-branched, 15ai—*anteiso*-C15:0 methyl-branched, 15n—C15:0 normal, 16i + ai—sum of *iso*-C16:0 and *anteiso*-C16:0 methyl-branched, 16n—C16:0 normal, 17i + ai—sum of *iso*-C17:0 and *anteiso*-C17:0 methyl-branched, 17n—C17:0 normal. *C. acnes* IA1, DSM 1897; *C. acnes* IB, DSM 16379; *C. acnes* II, PCM 2334; *C. acnes* III, NCTC 13655; *C. avidum* DSM 4901; *C. granulosum* PCM 2462; *C. granulosum* PCM 2401; *C. namnetense* DSM 29427. (B) Heatmap of fatty acids. The values represent log2 of the ratio to the median of each analyte, and the color key depicts low (blue) to high (red) relative content for each analyte. Cluster analysis is based on Euclidean distances. Analytes that have not been identified are labeled n.d. (not determined).

analyzed fatty acids, these strains contained relatively lower amounts (less than the median of the data set). Interestingly, this group is characterized by nondetectable levels of *iso*- and *anteiso*-C16:0 (with one exception, *C. granulosum* PCM 2401). In addition, nonbranched C16:0 was present at relatively low levels. In the second cluster represented by three strains, *C. acnes* (DSM 16379 and PCM 2334) and *C. granulosum* PCM 2462, the *C. acnes* substrains displayed similarly elevated levels of branched odd-numbered fatty acids (*iso*-C15:0, *anteiso*-C15:0, *iso*- and *anteiso*-C17:0). This is not the case for *C. granulosum* PCM 2462, which also showed relatively low levels of normal C15:0 fatty acid. The *C. namnetense* DSM 29427 species stands out from the remaining clusters because it is characterized by a high content of all fatty acids (Fig. 1B).

Lipidomic analysis

To obtain as much information as possible on the composition of lipid extracts from eight strains of *Cutibacterium*, mass spectrometry was performed in both positive and negative ionization modes. The mean total ion current was significantly lower in the negative ionization mode, which was reflected by the lower number of annotated lipids. The results obtained from the LC-MS analysis in the positive ion mode allowed for the identification, annotation, and determination of the peak areas of individual analytes for total metabolites. The pool is composed of glycerolipids (52 analytes), glycerophospholipids (8 analytes), sphingolipids (25 analytes), and fatty acid amides (5 analytes).

Principal component analysis (PCA) is a tool that allows for a thorough comparative analysis of multidimensional data sets such as lipid profiles. The analysis included 90 identified lipid compounds, which highlighted differences and similarities between individual bacterial phylotypes of *C. acnes*, the so-called "acnes group" (Fig. 2). The first principal component and the second principal component accounted for 44.15% of the variance. The analytes that mostly determined this resolution were triacylglycerols (TGs) and sphingomyelins (SMs), especially those located at the extremes of the principal components TG 45:0, TG 46:0, TG 52:2, TG 52:4, TG 54:0 and SM 30:1, SM 33:1 B, and SM 35:1 A (where the letters A and B indicate different chain configurations in the lipid molecule). The "acnes group" is visible through clustering in the first component,



FIG 2 PCA of the lipid profiles of Cutibacterium spp. based on 90 annotated lipid analytes in positive ion mode. Each of the two replicates is represented by a colored dot.

especially for the DSM 1897 and NCTC 13655 strains, which are conditioned by similar loadings, such as SM 33:1 A, SM 35:1 A, phosphatidylcholine (PC) 32:0 A, and N-acylethanolamine (NAE) 17:1. The first component also shows the relatively close proximity of the strains belonging to *C. granulosum* PCM 2401 and PCM 2462 while emphasizing the distinctiveness of the only representative of *C. avidum* DSM 4901. The close distribution of the *C. namnetense* DSM 29427 and *C. acnes* DSM 16379 strains is also not surprising—the above data coincide with the clustering shown on the heatmap (Fig. 4).

The results obtained from the LC-MS analysis in negative ion mode allowed for the identification of 38 analytes (Fig. 3). Due to the lower intensity of the mass spectra obtained in negative ion mode, the analysis was performed in triplicate. The first and second principal components accounted for 53.01% of the variance. The above results indicate the high repeatability of the obtained data while confirming the relationships presented on the heatmap (Fig. 6). Clustering is similar to that shown in PCA in the positive ion mode—the close affinity of the "acnes group" is very clear and is differentiated, especially by the first component. This approach also enabled the observation of interspecies differences, mainly between strains belonging to *C. acnes, C. granulosum*, and *C. avidum*. Among the analytes that had a particular impact on this distribution, cardiolipins (CLs) should be distinguished, especially CL 12:0_12:0_12:0_15:0 and CL 12:0_14:0_12:0_15:0. In addition, the fatty acids FA 16:0, FA 18:0, phosphatidylglycerol (PG) 26:0 and PG, which have an alkyl ether substituent (PG O-35:0), contributed significantly.

Based on the similarity of the profiles obtained by Euclidean distance clustering in positive ion mode, one can distinguish two main clusters of cutibacterial strains (Fig. 4). The first one contained *C. granulosum* PCM 2401 and 2462 with the more distant *C. avidum* DSM 4901; the second grouped together all four tested phylotypes belonging to the *C. acnes* species with the distinction of close clustering of *C. acnes* PCM 2334 and NCTC 13655 and in the minor cluster *C. acnes* DSM 1897 and 16379 with the more distant *C. namnetense* DSM 29427.

The glycerolipid class in *Cutibacterium* spp. is represented mainly by triacylglycerols and diacylglycerols (TG and DG, respectively). Among the TGs, 43 analytes were identified with carbon atoms in their acyl chains ranging from 41 to 57 with different



FIG 3 PCA of the lipid profiles of *Cutibacterium* spp. based on 38 annotated lipid analytes in negative ion mode. Each of the three replicates is represented by a colored dot.



FIG 4 Heatmap of lipid analytes present in *Cutibacterium* spp. measured in positive ion mode. The values represent log2 of the ratio to the median of each analyte, and the color key depicts low (blue) to high (red) relative content for each analyte. Cluster analysis is based on Euclidean distances.

desaturation grades—up to four unsaturated bonds. Differences in the quantitative content of lipids belonging to the TG subclass are very clearly reflected by the main clustering visible on the heatmap (Fig. 4), where they appear in the form of two distinct blocks. The characteristic block with a relatively high content of nine TG species (TG 42:1, TG 48:2, TG 50:0, TG 50:1, TG 50:2, TG 51:1, TG 52:1, TG 52:4, and TG 54:3) is located in the middle part of the cluster, which includes the acnes group. These lipids were most abundant in *C. namnetense* DSM 29427 and *C. acnes* DSM 16379 and to a lesser extent in *C. acnes* DSM 1897, which resulted in their clustering. However, in the cluster containing *C. granulosum* PCM 2401 and 2462 and *C. avidum* DSM 4901, there was a clear decrease in the content of TG 44:0, TG 50:2, TG 51:0, TG 54:0, and TG 56:0. The quantitative differences in the above characteristics of the TGs identified in the tested cutibacterial strains are shown in representative bar plots for TG 45:2 (Fig. 5A) and TG 55:1 (Fig. 5B).

In the other subclass of nonpolar glycerolipids, nine DG analytes were identified. It was characterized by the number of carbon atoms in the acyl chain ranging from 30 to 38 and the presence of up to five unsaturated bonds. Particularly noteworthy is DG 38:0, a metabolite found in significant amounts in *C. namnetense* and in lower amounts in other cutibacterial strains, especially *C. acnes* PCM 2334 and NCTC 13655 (Fig. 5D). DG species analysis also provided information on the elevated amount of DG 30:0 in *C. acnes* NCTC 13655 relative to other strains (Fig. 5C). However, it is not the only analyte that

Research Article



FIG 5 Bar plots of lipid analyte content in *Cutibacterium* spp. measured in positive ion mode: (A) TG 45:2, (B) TG 55:1, (C) DG 30:0, (D) DG 38:0, (E) PC 30:0, (F) PC 34:2A, (G) SM 35:1A, (H) SM 33:1A, and (I) NAE 17:1. The order of *Cutibacterium* in the bar plots was as follows: *C. acnes* IA1, DSM 1897; *C. acnes* IB, DSM 16379; *C. acnes* III, NCTC 13655; *C. avidum* DSM 4901; *C. granulosum* PCM 2401; *C. granulosum* PCM 2462; *C. namnetense* DSM 29427; and *C. acnes* II, PCM 2334.

distinguishes the "acnes group"—it was also characterized by an elevated DG 32:0 level compared to that of other cutibacteria.

GPs are a heterogeneous class of lipid compounds with phosphatidyl esters attached to the terminal carbon of glycerol. The most abundant PC were PCs, of which we identified eight PCs (PC 30:0, PC 32:0 A, PC 32:0 B, PC 34:1 A, PC 34:1 B, PC 34:2 A, PC 34:2 B, and PC 36:1). In this subclass, a maximum of two unsaturations were observed. Within this entire group of analytes, PC 30:0 (Fig. 5E) stands out because it occurs in significant amounts only in one strain, *C. acnes* DSM 16379. Particularly noteworthy is the metabolite PC 34:2 A (Fig. 5F), which is present in large amounts and is characteristic of both *C. granulosum* strains (PCM 2401 and PCM 2462) and *C. namnetense* DSM 29427.

Among the sphingolipids, 25 compounds belonging to the sphingomyelin (SM) subclass were identified. The length of the SM carbon chains was in the range of 30–35 atoms, and maximum single unsaturation was observed. A particularly spectacular example where SM allows the differentiation of strains from each other is SM 35:1 A (Fig. 5G), the presence of which in significant amounts was detected only in *C. acnes* NCTC 13655. The "acnes group" is also represented by the characteristic SM 30:1 analyte (data not shown), which is almost absent in the other *Cutibacterium* strains tested. Notably, the

content of the analyte SM 33:1 A (Fig. 5H) in *C. namnetense* DSM 29427 was significantly greater than that in the other cutibacteria.

The last lipid class of reported analytes in positive ion mode was N-acylethanolamines (NAEs), which are fatty acid amides. Five of these compounds were identified, with acyl chain lengths ranging from 15 to 21 carbon atoms (NAE 15:1, NAE 17:1, NAE 18:1, NAE 19:1, and NAE 21:1). Of particular interest is the NAE 17:1, which distinguishes the "acnes group" together with *C. avidum* DSM 4901 from *C. granulosum* spp. and *C. namnetense* DSM 29427 (Fig. 5I).

A total of 38 compounds were identified in the negative ion mode. These analytes belong to two classes of lipids: fatty acids (FAs) and glycerophospholipids. The heatmap in negative ion mode (Fig. 6) shows the "acnes group" clustering, which includes the close similarity between the lipid profiles of strains DSM 1897 and 16379 (phylotypes IA1 and IB), as well as between PCM 2334 and NCTC 13655 (phylotypes II and III). The second main cluster also closely resembled both *C. granulosum* strains and *C. avidum* DSM 4901 and *C. namnetense* DSM 29427. The clustering results on the heatmap in negative ion mode were different from those in positive ion mode, where *C. namnetense* DSM 29427 was in the main cluster with the "acnes group." A particularly visible block is the high content of CL 16:0_15:1_18:0_18:0 and CL 12:0_12:0_12:0_15:1 in both *C. granulosum* strains, which is clearly reduced in the "acnes group." A high PG content also distinguishes strains belonging to the *C. acnes* subspecies from those belonging to the other tested cutibacteria.



FIG 6 Heatmap of lipid analytes present in *Cutibacterium* spp. measured in negative ion mode. The values represent log2 of the ratio to the median of each analyte, and the color key depicts low (blue) to high (red) relative content for each analyte. Cluster analysis is based on Euclidean distances.

The LC-MS results complement the fatty acid analysis performed by GC-MS, whereas the GC-MS analysis through acid methanolysis produced a picture of all fatty acids bound in various esters. In the LC-MS analysis, we recorded profiles of free fatty acids. The number of carbon atoms in their acyl chains ranged from 15 to 18. Two analytes from this class deserve special attention—C15:0 and C17:0 (Fig. 7B). In both cases, the content was severalfold greater in strains *C. granulosum* PCM 2462 and *C. avidum* DSM 4901. These two factors contributed to the clustering of these two strains, as shown in the heatmap (Fig. 6).

Within the class of glycerophospholipids, cardiolipins (CLs), phosphatidylglycerols (PGs), lysophosphatidylglycerol (LPG), and phosphatidylinositols (PIs) have been identified. In the lipid profile, there were 13 CLs, of which the acyl chains were 13–18 carbon atoms long, and the total number of unsaturated fatty acids among the six fatty acids reached 3. Through analysis of MS/MS spectra, we were able to identify fatty acid-building cardiolipins in *Cutibacterium* spp. Therefore, wherever possible, we used here extended notation of this class, with all four fatty acids separated by an underscore sign (see below). In contrast to the results in the positive ion mode, for CL, no such unambiguous clustering for the "acnes group" was visible. Clear similarities of profiles are observed in this group (e.g., CL 14:0_14:0_15:0_18:0) (Fig. 7C), but this is not as evident as in the case of both *C. granulosum* PCM 2401 and 2462, where metabolites such as CL 12:0_12:0_12:0_15:1 or CL 16:0_15:1_18:0_18:0 (Fig. 6 and 7D) show a very species-specific pattern.

Among the PG subclasses, one lysoPG (LPG), six PGs with an alkyl ether substituent (PG O), and eight regular PGs were identified. In the case of LPG 15:0, this lipid is practically absent from the extract of *C. granulosum* PCM 2462. However, the distribution of PG-O subclass analytes seems interesting—these compounds occur in greater amounts only in the *C. acnes* strains; PG O-32:0, PG O-33:0, PG O-34:0, and PG O-35:0 are analytes characteristic of *C. acnes* DSM 16379 (Fig. 7E). PGs were also dominant in all *C. acnes* strains, especially PG 15:0_15:0 (Fig. 7F) and PG 15:0_17:0.

The last lipid subclass identified was the PI. Among the six analytes, the total length of the acyl chains ranged from 27 to 32 carbon atoms. Similarly to CL, where possible, we used the extended notation of this class, with two fatty acids separated by an underscore sign. A clearly distinguishable lipid was PI 15:0_15:0, whose amount was fourfold to fivefold greater in *C. acnes* NCTC 13655 and DSM 1897 than in the others (Fig. 7G). A similar relationship was observed for PI 32:0 (Fig. 7H).

DISCUSSION

In recent years, lipidomics, in addition to protein profiling, has been proven to be a useful tool for defining cellular fingerprints, which will allow for the precise identification of microorganisms. Consequently, lipids may become novel molecular markers of bacterial cells (26, 27). To date, most scientific reports have focused mostly on the lipidome of a single (13) and, less often, several bacterial strains (28). By combining GC-MS analysis, which produces a picture of all fatty acids bound to various cellular lipid esters, with LC-MS, which can provide clues about which lipids these fatty acids are bound to, we performed a comprehensive, comparative lipidomic analysis of *Cutibacterium*, which has not been conducted thus far.

Fatty acid (FA) characterization of propionic acid bacteria was previously performed in 1969 (29). Moss et al. described the quantitative predominance of methyl-branched 15:0 fatty acids, followed by normal 15:0, 16:0, and 17:0 fatty acids. FAs longer than 18 carbon atoms in the acyl chain, for example, C20:0 to C23:0, have also been reported to occur but less frequently and in lower amounts. This is confirmed by the work of Cummins et al. in which the composition of FAs in *Propionibacterium propionicum* cells was analyzed, and a quantitative dominance of *iso*-methyl-branched C 15:0 was observed (30). These studies indicate that odd-carbon-chain FAs with a predominance of *iso*-methyl-branched C 15:0 are characteristic of *Propionibacteriaceae*. This explains why the construction of lipids with a specific chain length did not significantly exceed 20 carbon atoms and



FIG 7 Bar plots of lipid analyte content in *Cutibacterium* spp. measured in negative ion mode: (A) FA 15:0, (B) FA 17:0, (C) CL 14:0_14:0_15:0_18:0, (D) CL 16:0_15:1_18:0_18:0, (E) PG 0-32:0, (F) PG 15:0_15:0, (G) PI 15:0_15:0, and (H) PI 32:0. The order of *Cutibacterium* in the bar plots was as follows: *C. acnes* IA1, DSM 1897; *C. acnes* IB, DSM 16379; *C. acnes* III, NCTC 13655; *C. avidum* DSM 4901; *C. granulosum* PCM 2401; *C. granulosum* PCM 2462; *C. namnetense* DSM 29427; and *C. acnes* II, PCM 2334.

clearly corresponds to the results of our work obtained through GC-MS and LC-MS analyses in negative ion mode.

The first report that provided insight into the complex lipids of *Cutibacterium acnes* was published in 2018 (31). The observations presented by Jeon et al. are consistent with our results—the most abundant lipid compounds in *Cutibacterium* spp. are nonpolar TGs. We also made similar observations for the length of fatty acid chains present in TGs and the number of unsaturated bonds. These findings also held true for the DG subclass. Among glycerophospholipids, four main subclasses of lipids in both ionization modes have been detected and reported. PCs are lipids that commonly build cell membranes in eukaryotes, but they are quite rare in bacteria. It is estimated that they are found in approximately 15% of prokaryotes (32). It is a lipid characteristic of pathogenic microorganisms, as it has been identified in Brucella, Bartonella, Pseudomonas, Francisella, Borrelia, and Legionella. Hence, it is presumed that the presence of PCs in bacteria is important for interactions with host cells (32). In our study, we detected seven analytes belonging to the PC and recorded differences in their contents, which allowed us to distinguish between Cutibacterium species. The presence of PC in C. acnes was also reported in previous studies (31). While the presence of PC in Cutibacterium can be considered one of the characteristics of this genus, PGs or CLs are common components that build bacterial membranes (33). Studies indicate that CLs play a significant role in the response of bacterial cells to stress by increasing their quantitative participation in membranes at the expense of the amount of PEs (34). Interestingly, there has been no publication describing the presence of CLs in Cutibacterium thus far. In this work, it was possible to identify CLs that had a significant impact on the clustering of strains visible on the heatmap, especially CL 16:0_15:1_18:0_18:0 and CL 12:0_12:0_12:0_15:1, which were highly abundant in both strains of C. granulosum and to a lesser extent in C. namnetense.

The presence of lipids possessing an ether-linked alkyl chain in propionic acid bacteria was confirmed by Paściak et al. (35). These characteristic and rare compounds, being sugar derivatives of glycerol ethers, were identified for the first time in *Propionibacterium propionicum* PCM 2431. In our study, lipids from the PG subclass that also contained an alkyl ether substituent were identified. These compounds occurred in significant amounts primarily in the *C. acnes* DSM 16379 strain.

The pathway of PI synthesis in bacteria such as *Cutibacterium acnes* was described by Morii et al. (36). The occurrence of PIs has already been reported for *Mycobacterium* and *Actinomycetales, which are* phylogenetically related to *Cutibacterium* (37). We detected six analytes from this subclass in the tested strains, and high amounts of PI (15:0_15:0) were detected, especially in the strains *C. acnes* NCTC 13655, *C. granulosum* PCM 2401, and *C. avidum* DSM 4901.

For many years, it was believed that sphingolipids were not very common in bacteria, except a few, mainly anaerobic genera: *Bacteroides, Prevotella, Porphyromonas, Fusobacterium, Sphingomonas, Sphingobacterium, Bdellovibrio, Cystobacter, Mycoplasma, Flectobacillus*, and *Acetobacter* (38). Nevertheless, ceramides and SMs have been previously identified in *Cutibacterium acnes* (31). SM was the only representative sphingolipid class that was identified in our experiments. Importantly, differences in the contents of SM 33:1 A and SM 35:1 A, which are present in some strains but are virtually absent in others, could be potential lipid markers for these bacteria.

Another analyte found in *Cutibacterium* for the first time was NAE. The role of these bioactive lipids in eukaryotes is well understood, as they exhibit anti-inflammatory and neuroprotective properties (39). They are also called endocannabinoids because they actively modulate cannabinoid receptors. At the same time, its precursor is NAPE (N-acylphosphatidylethanolamine), a phospholipid formed as a result of the transfer of an acyl group chain from an acyl donor to the primary amine ethanolamine moiety of PE (40). To date, little is known about NAE and NAPE in bacteria. It is presumed that NAPE acts as a stabilizer of the cell membrane, preventing damage to the cell membrane and supporting cell division, similar to CLs (41, 42).

Numerous papers have shown that C. acnes phylotypes differ not only phenotypically and phylogenetically but also in the expression of virulence factors (43). Therefore, despite C. acnes strains occupying the same biological niche to which sebaceous gland-rich skin belongs, each of them (types IA1, IB, II, and III) exhibits pathogenic or commensal potential. Type I strains in particular are described as those most abundantly producing lipases, proteinases, and hyaluronidases, and type IA1 has previously been isolated from acne-prone skin; hence, it is considered a particularly virulent and prevalent strain in conditions such as *acne vulgaris* (44). By analyzing the lipidome of each C. acnes strain tested in this study, we were able to observe individual lipid compounds that can be considered markers for a given phylotype. A particular example is C. acnes DSM 16379 (type IB), which has a significant amount of PC 30:0. In addition to their obvious structural role, these PCs presumably play a role in virulence determination, thus confirming the pathogenic potential of type I strains (45). Type II and III C. acnes are considered to represent "healthy skin" microbiota (46). While some bacterial species are capable of producing sphingolipids, they can also acquire them from a mammalian host. The acquired sphingolipids can then be modified by bacterial enzymes to produce new sphingolipids, which help to conceal microorganisms from the host immune system (47). Particularly noteworthy is sphingomyelin SM 35:1, whose distinct amounts are observed only in C. acnes strains PCM 2334 and DSM 13655, which are type II and III, respectively. This finding supports the hypothesis that the acquisition and modification of host sphingolipids may lead to commensalism or hostile interactions (tissue damage/disease) (47).

C. granulosum inhabits the same biological niche as C. acnes on the surface of seborrheic skin prone to acne, which suggests the existence of a competitive mechanism between them (48). The two C. granulosum strains tested were distinguished from other cutibacteria by their high cardiolipin content (CL 16:0_15:1_18:0_18:0), which was absent in the other strains. In studies with another Gram-positive microorganism, Staphylococcus aureus, cardiolipin was confirmed to confer virulence to the pathogen by modulating kinase activity (49). The genus Cutibacterium is distinguished by C. avidum, whose ecological niche is located primarily on moist areas of the skin, especially the axillary region. Mostly, it is considered a commensal microorganism; however, it is also an underestimated opportunistic pathogen (50). According to our studies, C. avidum has the highest level of PI 32:0, which can be used as a precursor to produce glycosylphosphatidylinositol (GPI). GPI-anchored proteins can serve as adhesins and may play a role in virulence, especially in fungi and protozoa (51). Cutibacterium namnetense was originally isolated from bone infections, and subsequent reports of infections caused by this microorganism confirmed not only its propensity for deep infections but also its antibiotic resistance (52). In the C. namnetense strain, we also detected high levels of PI subclass lipids (PI 27:0 and PI 14:0_15:0), which, as indicated above, may be precursors that facilitate invasion in host organisms.

To date, Jeon et al. have performed lipidomic analysis of extracellular vesicles (EVs) released by these bacteria in addition to lipid analysis of *C. acnes* type IA1 (31). Our previous study of the lipid content of EVs from different *C. acnes* phylotypes showed that they have distinct lipid patterns (12). Further studies should also focus on EVs released by other representatives of *Cutibacterium* and compare the lipid content and function of both cells and EVs.

Promising results in the field of lipidomic analysis of *Cutibacterium* spp. constitute a good prognostic perspective for the use of analogous research among other lipophilic microorganisms. Because cutibacteria belong to the Actinobacteria phylum, a similar research approach could be appropriate for these microorganisms. In this regard, representatives of the genus *Mycobacterium* are particularly interesting subjects for lipidomic research due to their unique cell envelope. The lipid content of the *Mycobacterium* wall is very high—up to 40% of the dry cell mass (53). Comparative lipidomic analysis has already been performed within this genus and has enabled the differentiation of *Mycobacterium bovis*, which has monoglycosylated phenolic glycolipids (PGL) termed Mycoside B, from *Mycobacterium tuberculosis*, which has multiglycosylated PGL (54). Recently, a similar approach has been applied to *M. smegmatis*, and it was effective in analyzing other mycobacterial lipids (55).

In summary, our lipid profiling studies of *Cutibacterium* strains aimed to obtain comprehensive insight into the incompletely understood metabolism of these microorganisms. Findings such as strong differences in sphingomyelins or reports for the first time in *Cutibacterium* cardiolipins and N-acylethanolamines derived from odd-carbon fatty acids might help in designing new diagnostic tools for clinical microbiology or help in the selection of new antigenic compounds.

Conclusions

For the first time, such a broad, comparative analysis of the lipidome of various species from the *Cutibacterium* genus has been presented. We demonstrated that lipidomic studies can provide a precise fingerprint for individual microorganisms. A distinct profile of lipid metabolites allows for differentiation between cutibacterial species and phylotypes of *C. acnes*. The thorough analysis of the profiles enabled the identification of lipids, such as CLs or NAE, which have not been previously detected or reported in *Cutibacterium*. This study provides information about new putative lipid markers with high diagnostic potential in clinical microbiology.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences statutory grant 501-15. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conceptualization—M.P and A.C.; data curation—M.A.B.; formal analysis—A.C. and M.A.B.; investigation—A.C. and M.A.B.; methodology—A.C., M.A.B and M.P; project administration—M.P.; resources—A.G.; supervision—M.P., visualization—A.C. and M.A.B.; writing (original draft)—A.C. and M.A.B.; writing (review and editing)—A.C., M.A.B., A.G., and M.P.

AUTHOR AFFILIATIONS

¹Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wroclaw, Poland

²Department of Biochemistry and Immunochemistry, Wroclaw Medical University, Wroclaw, Poland

AUTHOR ORCIDs

Anna Chudzik http://orcid.org/0000-0003-2789-8300 Mariusz A. Bromke http://orcid.org/0000-0002-0806-6608 Andrzej Gamian http://orcid.org/0000-0002-2206-6591 Mariola Paściak http://orcid.org/0000-0002-2603-4634

DATA AVAILABILITY

Supporting data are available at https://ppm.umw.edu.pl/info/researchdata/UMW73b2c2eff1794074b919341340d9016a/.

REFERENCES

- Niazi SA, Clarke D, Do T, Gilbert SC, Mannocci F, Beighton D. 2010. *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from refractory endodontic lesions are opportunistic pathogens. J Clin Microbiol 48:3859–3869. https://doi.org/10.1128/JCM.01326-10
- Nakase K, Koizumi J, Midorikawa R, Yamasaki K, Tsutsui M, Aoki S, Nasu Y, Hirai Y, Nakaminami H, Noguchi N. 2021. Cutibacterium acnes

phylogenetic type IC and II isolated from patients with non-acne diseases exhibit high-level biofilm formation. Int J Med Microbiol 311:151538. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151538

- Holmberg A, Lood R, Mörgelin M, Söderquist B, Holst E, Collin M, Christensson B, Rasmussen M. 2009. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates. Clin Microbiol Infect 15:787–795. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02747.x
- Petersson F, Kilsgård O, Shannon O, Lood R. 2018. Platelet activation and aggregation by the opportunistic pathogen *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes*. PLoS One 13:e0192051. https://doi.org/10.1371/journal. pone.0192051
- Lomholt HB, Kilian M. 2010. Population genetic analysis of *Propionibacterium acnes* identifies a subpopulation and epidemic clones associated with acne. PLoS One 5:e12277. https://doi.org/10.1371/journal.pone. 0012277
- Mayslich C, Grange PA, Dupin N. 2021. Cutibacterium acnes as an opportunistic pathogen: an update of its virulence-associated factors. Microorganisms 9:303. https://doi.org/10.3390/microorganisms9020303
- Yedidya I, Goldberg E, Sharoni R, Sagie A, Vaturi M. 2015. Infective endocarditis caused by *Propionibacterium granulosum*. Isr Med Assoc J 17:642–643.
- Aubin GG, Bémer P, Kambarev S, Patel NB, Lemenand O, Caillon J, Lawson PA, Corvec S. 2016. *Propionibacterium namnetense* sp. nov., isolated from a human bone infection. Int J Syst Evol Microbiol 66:3393– 3399. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001204
- di Summa PG, Yvon A, Larcher L, Raffoul W, Koch N. 2015. Propionibacterium avidum infection following breast reduction: high morbidity from a low-virulence pathogen. J Surg Case Rep 2015:rjv002. https://doi.org/10. 1093/jscr/rjv002
- Wildeman P, Brüggemann H, Scholz CFP, Leimbach A, Söderquist B. 2016. Propionibacterium avidum as an etiological agent of prosthetic hip joint infection. PLoS One 11:e0158164. https://doi.org/10.1371/journal. pone.0158164
- Appala K, Bimpeh K, Freeman C, Hines KM. 2020. Recent applications of mass spectrometry in bacterial lipidomics. Anal Bioanal Chem 412:5935– 5943. https://doi.org/10.1007/s00216-020-02541-8
- Chudzik A, Migdał P, Paściak M. 2022. Different Cutibacterium acnes phylotypes release distinct extracellular vesicles. Int J Mol Sci 23:5797. https://doi.org/10.3390/ijms23105797
- Lorenzen W, Bozhüyük KAJ, Cortina NS, Bode HB. 2014. A comprehensive insight into the lipid composition of *Myxococcus xanthus* by UPLC-ESI-MS. J Lipid Res 55:2620–2633. https://doi.org/10.1194/jlr.M054593
- Ulrichs T, Moody DB, Grant E, Kaufmann SHE, Porcelli SA. 2003. T-cell responses to CD1-presented lipid antigens in humans with *Mycobacterium tuberculosis* infection. Infect Immun 71:3076–3087. https://doi.org/ 10.1128/IAI.71.6.3076-3087.2003
- Kaczmarek R, Pasciak M, Szymczak-Kulus K, Czerwinski M. 2017. CD1: a singed cat of the three antigen presentation systems. Arch Immunol Ther Exp 65:201–214. https://doi.org/10.1007/s00005-017-0461-y
- De Libero G, Mori L. 2005. Recognition of lipid antigens by T cells. Nat Rev Immunol 5:485–496. https://doi.org/10.1038/nri1631
- Chandler CE, Ernst RK. 2017. Bacterial lipids: powerful modifiers of the innate immune response. F1000Res 6:1334. https://doi.org/10.12688/ f1000research.11388.1
- Dessinioti C, Katsambas AD. 2010. The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies. Clin Dermatol 28:2–7. https:/ /doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.03.012
- Cronan JE, Thomas J. 2009. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways, p 395–433. In Methods in enzymology. Elsevier, Illinois, USA.
- Li Y, Wu S, Wang L, Li Y, Shi F, Wang X. 2010. Differentiation of bacteria using fatty acid profiles from gas chromatography-tandem mass spectrometry. J Sci Food Agric 90:1380–1383. https://doi.org/10.1002/ jsfa.3931
- Dekio I, McDowell A, Sakamoto M, Tomida S, Ohkuma M. 2019. Proposal of new combination, *Cutibacterium acnes* subsp. *elongatum* comb. nov., and emended descriptions of the genus *Cutibacterium, Cutibacterium acnes* subsp. *acnes* and *Cutibacterium acnes* subsp. *defendens*. Int J Syst Evol Microbiol 69:1087–1092. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003274
- Nouioui I, Carro L, García-López M, Meier-Kolthoff JP, Woyke T, Kyrpides NC, Pukall R, Klenk H-P, Goodfellow M, Göker M. 2018. Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria*. Front Microbiol 9:2007. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007

- McDowell A, Barnard E, Liu J, Li H, Patrick S. 2016. Proposal to reclassify Propionibacterium acnes type I as Propionibacterium acnes subsp. acnes subsp. nov. and Propionibacterium acnes type II as Propionibacterium acnes subsp. defendens subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 66:5358– 5365. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001521
- Scholz CFP, Kilian M. 2016. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. Int J Syst Evol Microbiol 66:4422–4432. https://doi.org/10.1099/ ijsem.0.001367
- Bromke MA, Giavalisco P, Willmitzer L, Hesse H. 2013. Metabolic analysis of adaptation to short-term changes in culture conditions of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. PLoS One 8:e67340. https://doi.org/10. 1371/journal.pone.0067340
- Okahashi N, Ueda M, Matsuda F, Arita M. 2021. Analyses of lipid A diversity in Gram-negative intestinal bacteria using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Metabolites 11:197. https://doi.org/10.3390/metabo11040197
- Langworthy TA, Tornabene TG, Holzer G. 1982. Lipids of archaebacteria. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg 3:228–244. https://doi. org/10.1016/S0721-9571(82)80036-7
- Walczak-Skierska J, Złoch M, Pauter K, Pomastowski P, Buszewski B. 2020. Lipidomic analysis of lactic acid bacteria strains by matrix-assisted laser desorption/lonization time-of-flight mass spectrometry. J Dairy Sci 103:11062–11078. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18753
- Moss CW, Dowell VR, Farshtchi D, Raines LJ, Cherry WB. 1969. Cultural characteristics and fatty acid composition of propionibacteria. J Bacteriol 97:561–570. https://doi.org/10.1128/jb.97.2.561-570.1969
- Cummins CS, Moss CW. 1990. Fatty acid composition of *Propionibacte*rium propionicum (Arachnia propionica). Int J Syst Bacteriol 40:307–308. https://doi.org/10.1099/00207713-40-3-307
- Jeon J, Park SC, Her J, Lee JW, Han J-K, Kim Y-K, Kim KP, Ban C. 2018. Comparative lipidomic profiling of the human commensal bacterium *Propionibacterium acnes* and its extracellular vesicles. RSC Adv 8:15241– 15247. https://doi.org/10.1039/c7ra13769a
- Geiger O, López-Lara IM, Sohlenkamp C. 2013. Phosphatidylcholine biosynthesis and function in bacteria. Biochim Biophys Acta 1831:503– 513. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.08.009
- Murzyn K, Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M. 2005. Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane. Biophys J 88:1091–1103. https://doi.org/10.1529/biophysj. 104.048835
- Romantsov T, Guan Z, Wood JM. 2009. Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. Biochim Biophys Acta 1788:2092–2100. https:// doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.06.010
- Paściak M, Holst O, Lindner B, Mordarska H, Gamian A. 2003. Novel bacterial polar lipids containing ether-linked alkyl chains, the structures and biological properties of the four major glycolipids from *Propionibacterium propionicum* PCM 2431 (ATCC 14157T). J Biol Chem 278:3948– 3956. https://doi.org/10.1074/jbc.M206013200
- Morii H, Ogawa M, Fukuda K, Taniguchi H. 2014. Ubiquitous distribution of phosphatidylinositol phosphate synthase and archaetidylinositol phosphate synthase in bacteria and archaea, which contain inositol phospholipid. Biochem Biophys Res Commun 443:86–90. https://doi. org/10.1016/j.bbrc.2013.11.054
- Morita YS, Yamaryo-Botte Y, Miyanagi K, Callaghan JM, Patterson JH, Crellin PK, Coppel RL, Billman-Jacobe H, Kinoshita T, McConville MJ. 2010. Stress-induced synthesis of phosphatidylinositol 3-phosphate in mycobacteria. J Biol Chem 285:16643–16650. https://doi.org/10.1074/ jbc.M110.119263
- Olsen I, Jantzen E. 2001. Sphingolipids in bacteria and fungi. Anaerobe 7:103–112. https://doi.org/10.1006/anae.2001.0376
- Bottemanne P, Guillemot-Legris O, Paquot A, Masquelier J, Malamas M, Makriyannis A, Alhouayek M, Muccioli GG. 2021. N-acylethanolaminehydrolyzing acid amidase inhibition, but not fatty acid amide hydrolase inhibition, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. Neurotherapeutics 18:1815–1833. https://doi. org/10.1007/s13311-021-01074-x
- Coulon D, Faure L, Salmon M, Wattelet V, Bessoule J-J. 2012. Occurrence, biosynthesis and functions of *N*-acylphosphatidylethanolamines (NAPE):

not just precursors of *N*-acylethanolamines (NAE). Biochimie 94:75–85. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.04.023

- Mileykovskaya E, Ryan AC, Mo X, Lin C-C, Khalaf KI, Dowhan W, Garrett TA. 2009. Phosphatidic acid and *N*-acylphosphatidylethanolamine form membrane domains in *Escherichia coli* mutant lacking cardiolipin and phosphatidylglycerol. J Biol Chem 284:2990–3000. https://doi.org/10. 1074/jbc.M805189200
- Zink K-G, Rabus R. 2010. Stress-induced changes of phospholipids in betaproteobacterium Aromatoleum aromaticum strain EbN1 due to alkylbenzene growth substrates. Microb Physiol 18:92–101. https://doi. org/10.1159/000287988
- Valanne S, McDowell A, Ramage G, Tunney MM, Einarsson GG, O'Hagan S, Wisdom GB, Fairley D, Bhatia A, Maisonneuve J-F, Lodes M, Persing DH, Patrick S. 2005. CAMP factor homologues in *Propionibacterium acnes*: a new protein family differentially expressed by types I and II. Microbiology (Reading) 151:1369–1379. https://doi.org/10.1099/mic.0.27788-0
- McDowell A, Perry AL, Lambert PA, Patrick S. 2008. A new phylogenetic group of *Propionibacterium acnes*. J Med Microbiol 57:218–224. https:// doi.org/10.1099/jmm.0.47489-0
- Geiger O, López-Lara IM, Sohlenkamp C. 2013. Phosphatidylcholine biosynthesis and function in bacteria. Biochim Biophys Acta 1831:503– 513. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.08.009
- Rozas M, Hart de Ruijter A, Fabrega MJ, Zorgani A, Guell M, Paetzold B, Brillet F. 2021. From dysbiosis to healthy skin: major contributions of *Cutibacterium acnes* to skin homeostasis. Microorganisms 9:628. https:// doi.org/10.3390/microorganisms9030628
- Heung LJ, Luberto C, Del Poeta M. 2006. Role of sphingolipids in microbial pathogenesis. Infect Immun 74:28–39. https://doi.org/10. 1128/IAI.74.1.28-39.2006
- Bronnec V, Eilers H, Jahns AC, Omer H, Alexeyev OA. 2021. Propionibacterium (Cutibacterium) granulosum extracellular DNase BmdE targeting

Propionibacterium (cutibacterium) acnes biofilm matrix, a novel interspecies competition mechanism. Front Cell Infect Microbiol 11:809792. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.809792

- Yeo W-S, Dyzenhaus S, Torres VJ, Brinsmade SR, Bae T. 2023. Regulation of bacterial two-component systems by cardiolipin. bioRxiv. https://doi. org/10.1101/2023.02.01.526740
- Corvec S. 2018. Clinical and biological features of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) avidum, an underrecognized microorganism. Clin Microbiol Rev 31:e00064-17. https://doi.org/10.1128/CMR. 00064-17
- Reynolds TB. 2009. Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: making it and taking it. Microbiology (Reading) 155:1386–1396. https://doi.org/10.1099/mic. 0.025718-0
- Corvec S, Guillouzouic A, Aubin GG, Touchais S, Grossi O, Gouin F, Bémer P. 2018. Rifampin-resistant *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *namnetense* superinfection after *Staphylococcus aureus* bone infection treatment. J Bone Joint Infect 3:255–257. https://doi.org/10.7150/jbji. 30029
- Jackson M. 2014. The mycobacterial cell envelope-lipids. Cold Spring Harb Perspect Med 4:a021105. https://doi.org/10.1101/cshperspect. a021105
- Layre E, Al-Mubarak R, Belisle JT, Branch Moody D. 2014. Mycobacterial lipidomics. Microbiol Spectr 2:2. https://doi.org/10.1128/microbiolspec. MGM2-0033-2013
- Sakallioglu IT, Maroli AS, Leite ADL, Powers R. 2022. A reversed phase ultra-high-performance liquid chromatography-data independent mass spectrometry method for the rapid identification of mycobacterial lipids. J Chromatogr A 1662:462739. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021. 462739

Wnioski

- 1. Odmienność genotypowa i fenotypowa filotypów *Cutibacterium acnes* znajduje odzwierciedlenie w składzie białek i lipidów budujących pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (Chudzik et al. 2022).
- 2. Obserwowane różnice w profilach lipidowych komórek *Cutibacterium acnes* i pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wskazują na selektywne kierowanie lipidów do pęcherzyków (Chudzik et al. 2022).
- 3. Profilowanie lipidomiczne umożliwia precyzyjne różnicowanie bakterii na poziomie gatunków oraz filotypów (Chudzik et al. 2024).
- 4. Po raz pierwszy w rodzaju *Cutibacterium* opisano lipidy należące do podklas amidów kwasów tłuszczowych i kardiolipin (Chudzik et al. 2024).
- W lipidomach bakterii rodzaju *Cutibacterium* wykryto markery lipidowe o potencjale diagnostycznym: fosfatydylocholinę PC 30:0, sfingomieliny SM 33:1 i SM 35:1 oraz fosfatydyloglicerol z podstawnikiem alkiloeterowym PG O-32:0 (Chudzik et al. 2024).

Osiągnięcia

mgr Anna Chudzik

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej; Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk

Edukacja:

10.2019 – obecnie Wrocławska Szkoła Doktorska Instytutów Polskiej Akademii Nauk

10.2013 – 03.2019 Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Wydział Farmaceutyczny, kierunek Farmacja, studia jednolite magisterskie

Publikacje:

- Witek K., Latacz G., Kaczor A., Czekajewska J., Zesławska E., Chudzik A., Karczewska E., Nitek W., Kieć-Kononowicz K., Handzlik J. (2020). Phenylpiperazine 5,5-Dimethylhydantoin Derivatives as First Synthetic Inhibitors of Msr(A) Efflux Pump in *Staphylococcus epidermidis*, *Molecules*, 25, 3788. IF₂₀₂₀= 4.412; MEiN= 100
- Chudzik A., Paściak M. (2020). Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako mediatory komunikacji międzykomórkowej, *Postepy Hig Med Dosw*, 74, 572-588. IF₂₀₂₀= 0.27; MEiN= 40
- Chudzik A., Migdał P., Paściak M. (2022). Different *Cutibacterium acnes* Phylotypes Release Distinct Extracellular Vesicles, *IJMS*, 23(10), 5797. IF₂₀₂₂= 5.6; MEiN= 140
- Kozińska M., Augustynowicz-Kopeć E., Gamian A., Chudzik A., Paściak M., Zdziarski P. (2023). Cutaneous and Pulmonary Tuberculosis—Diagnostic and Therapeutic Difficulties in a Patient with Autoimmunity, *Pathogens*, 12(2), 331. IF₂₀₂₂= 3.7 MEiN= 100
- Zdziarski P., Paściak M., Chudzik A., Kozińska M., Augustynowicz-Kopeć E., Gamian A. (2023). Cutaneous tuberculosis—ambiguous transmission, bacterial diversity with biofilm formation in humoral abnormality: case report illustration, *Front Public Health*, 11, 1091373. IF₂₀₂₂= 5.2 MEiN= 100
- Chudzik A., Jalkanen K., Täubel M., Szponar B., Paściak M. (2024). Identification of environmental Actinobacteria in buildings by means of chemotaxonomy, 16S rRNA sequencing, and MALDI-TOF MS, *Microbiol Spectr*, 5;12: e0359623 IF₂₀₂₂= 3.7 MEiN= 100

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

Uczestnictwo w projektach naukowych:

- Wykonawca w projekcie NCN Opus 11 (2016/21/B/NZ7/01742) jako studentstypendysta; grant pt.: Funkcjonalnie selektywni odwrotni agoniści receptora 5-HT6 oraz podwójne inhibitory 5-HT6/MAO-B - w poszukiwaniu nowych podejść terapeutycznych do leczenia choroby Alzheimera. (Kierownik projektu: Prof. Paweł Zajdel, Uniwersytet Jagielloński - Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny, 06.2017 - 02.2018)
- Wykonawca w projekcie ABM/2023/2 jako specjalista; grant pt.: Onkologiczne Specjalistyczne Centrum Medycyny Cyfrowej (OnkoSCMC). (Lider: Dolnośląskie Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii, konsorcjant: Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, 12.2023 – 12.2027).

Uczestnictwo w konferencjach:

- 1. Prezentacja ustna na konferencji "International Medical Students' Conference", pt.: "The evaluation of imidazolone derivatives as potential MAO-B inhibitors", autorzy: Chudzik A., Cichoń U., Synak D. 19-21.04.2018, Kraków
- Prezentacja posteru na konferencji "XV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie" pt.: "Ocena mikrobiologicznego zanieczyszczenia maseczek ochronnych używanych przez mieszkańców Zielonej Góry w epidemii Covid -19", autorzy: Chudzik A., Stawicki M., Zieliński A., Baumann W., Donderska M. 20-22.06.2022, Toruń
- Prezentacja posteru na konferencji "XXIX Zjazd PTM Polskie Towarzystwo Mikrobiologów" pt.: "Identyfikacja drobnoustrojów z rodzaju *Propionibacterium* metodą spektrometrii mas MALDI-TOF", autorzy: Chudzik A., Paściak M. 15-17.09.2022, Warszawa
- Współautorstwo posteru prezentowanego na konferencji "The last word belongs to microbes – Celebrating the 200th anniversary of the birth of Louis Pasteur" pt.: "Protein and lipid profiles of extracellular vesicles of *Cutibacterium acnes*", autorzy: Chudzik A., Paściak M. 29-30.11.2022, Warszawa
- 5. Współautorstwo posteru prezentowanego na konferencji "Paths of Glycobiology. Jerzy Kościelak Memorial Conference" pt.: "Chemical characteristics of glycolipids present in *C. acnes* cells and secreted extracellular vesicles", autorzy: Chudzik A., Kaszowska M., Kapczyńska K., Smoliński J., Paściak M. 28-29.09.2023, Wrocław