

Załącznik nr 2

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

## **Autoreferat**

**„Identyfikacja bakteryjnych kompleksów białkowych o kluczowym znaczeniu dla fizjologii i rozwoju antybiotykooporności prątków gruźlicy, na podstawie badania oddziaływań białko-białko lub białko-kwas nukleinowy”**

**Dr Przemysław Adam Płociński**

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Łódzki,

ul. Banacha 12/16,

90-237 Łódź

## Spis treści

<b>1. Imię i nazwisko</b>	4
<b>2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej</b>	4
<b>3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych</b>	5
<b>4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)</b>	6
<b>4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego</b>	6
<b>4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zawarte w niniejszej rozprawie habilitacyjnej</b>	6
<b>4.3 Opis osiągnięcia naukowego</b>	10
<b>4.3.1 Cel naukowy cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe</b>	10
<b>4.3.2 Wprowadzenie</b>	10
<b>4.3.3 Etap 1</b>	12
<b>4.3.4 Etap 2</b>	18
<b>4.3.5 Podsumowanie</b>	27
<b>4.3.7 Opis pozostałych osiągnięć naukowych lub artystycznych</b>	28
<b>5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej</b>	45
<b>5.1. Pobyty w zagranicznych jednostkach naukowych</b>	45
<b>5.2 Współpraca naukowa poparta wspólnymi publikacjami lub aplikacjami o finansowanie badań na szczeblu krajowym lub międzynarodowym</b>	46
<b>6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę</b>	48
<b>6.1 Osiągnięcia dydaktyczne</b>	48
<b>6.1.1 Opieka naukowa nad studentami</b>	49
<b>6.1.2 Opieka naukowa nad stażystami</b>	49

<b>6.1.3. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego</b> .....	50
<b>6.2 Aktywność popularyzatorska</b> .....	51
<b>7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej ...</b>	52
<b>7.1 Specjalistyczne kursy i pełnione funkcje</b> .....	52
<b>Appendix 2: Summary of Professional Accomplishments</b> .....	54

## 1. Imię i nazwisko

Przemysław Adam Płociński

<https://orcid.org/0000-0002-6623-3494>

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

**2012** dyplom ukończenia studiów podyplomowych „Informatyka”, na wydziale Matematyki i Informatyki Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź,

**2011** **doktor nauk medycznych,**  
dyscyplina: biologia medyczna, specjalność: mikrobiologia,  
z wyróżnieniem,  
Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk, Łódź,

Tytuł rozprawy: „**Charakterystyka białka CrgA zaangażowanego w syntezę ściany komórkowej w procesie podziału komórki *Mycobacterium tuberculosis***”

*promotor pracy: Prof. dr hab. Jarosław Dziadek*

*promotor pomocniczy: Prof. Malini Rajagopalan*

**2007** **magister biologii, ze specjalnością mikrobiologia,**  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź,

Tytuł pracy magisterskiej: „**Wpływ prolaktyny na replikację *Toxoplasma gondii in vitro***”

*promotor pracy: Prof. dr hab. Henryka Długońska*

### 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

**2020 - obecnie** **adiunkt** w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, w Łodzi

**2016 - obecnie** **adiunkt** w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*, Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk, w Łodzi, niepełny wymiar etatu

**2014** **asystent naukowy** w Oddziale Badań nad *Mycobacterium*, w Narodowym Instytucie Badań Medycznych (org. Medical Research Council National Institute for Medical Research, Instytut Francisa Cricka), w Londynie, w Wielkiej Brytanii, 6 miesięcy (styczeń - czerwiec)

*oddelegowany z Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, w Warszawie, w ramach urlopu bezpłatnego,*

**2014 - 2016** **biolog** w Pracowni Biologii RNA i Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, w Warszawie, urlop bezpłatny,

**2010 - 2013** **asystent** w Pracowni Biologii RNA i Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, w Warszawie,

**2007 - 2010** **asystent naukowy** w Centrum Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Teksańskiego w Tyler, (org. The University of Texas, Health Science Center at Tyler), Tyler, Teksas, USA.

## **4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)**

### **4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego**

**„Identyfikacja bakteryjnych kompleksów białkowych o kluczowym znaczeniu dla fizjologii i rozwoju antybiotykooporności prątków gruźlicy, na podstawie badania oddziaływań białko-białko lub białko-kwas nukleinowy”**

### **4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zawarte w niniejszej rozprawie habilitacyjnej**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl pięciu pierwszoautorskich, jednotematycznych publikacji naukowych, opisujących wyniki prac eksperymentalnych prowadzonych wielośrodkowo w ramach współpracy międzynarodowej i podczas długoterminowych staży w zagranicznych ośrodkach naukowych. Ze względu na zbiorowy charakter opracowań, wkład poszczególnych autorów został udokumentowany w załączniku nr. 4 do przedłożonego wniosku. Kopie publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne dołączono w postaci załącznika nr. 5 do wniosku o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego.

Prace stanowiące osiągnięcie naukowe opisują identyfikację nieopisanych wcześniej kompleksów białkowych lub dopełnienie identyfikacji kompleksów białkowych o nowe, nieznane wcześniej komponenty dla wielobiałkowych układów enzymatycznych obecnych w komórkach prątków gruźlicy: kompleksu syntezy ściany komórkowej, kompleksu degradosomu RNA oraz nieopisanego dotąd systemu napraw uszkodzeń DNA. Zbadane kompleksy białkowe mają istotne znaczenie dla przeżywalności i namnażania się patogennych prątków, są obecnymi lub obiecującymi przyszłymi celami dla wynalezienia leków przeciwprątkowych lub mają znaczenie w powstawaniu i rozprzestrzeniania się zjawiska lekooporności u tych bakterii.

**Cykl stanowią prace:**

1. **Płociński P\*#**, Macios M, Houghton J, Niemiec E, Płocińska R, Brzostek A, Słomka M, Dziadek J, Young D, **Dziembowski A#**. „Proteomic and transcriptomic experiments reveal an essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*”. *Nucleic Acids Research*. 2019 Apr 8. pii: gkz251. doi: 10.1093/nar/gkz251. **IF<sub>2019</sub>=11.502**; **MEiN<sub>2023</sub>=200**; liczba cytowań=30;

Jestem pierwszym i korespondującym autorem tej pracy. Badania rozpocząłem podczas mojego zatrudnienia w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, kontynuowałem je podczas mojego zatrudnienia w Instytucie Francisa Cricka w Londynie w Wielkiej Brytanii i zakończyłem przygotowując manuskrypt opisujący wyniki w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi. W tej pracy mam przypisaną potrójną afiliację, ponieważ badania we wszystkich trzech jednostkach prowadziłem w ramach osobnych umów o pracę. Wraz z Prof. Dziembowskim przygotowałem koncepcję badań, samodzielnie prowadziłem większość prac eksperymentalnych i koordynowałem prace eksperymentalne pozostałych członków zespołu. Odpowiadam za analizę i interpretację wyników przeprowadzonych badań, opracowanie materiału ilustracyjnego oraz znaczącej większości treści manuskryptu. Moje zaangażowanie polegało też na przygotowaniu odpowiedzi na recenzje pierwotnego manuskryptu, wraz z niezbędnymi uzupełnieniami eksperymentalnymi oraz depozycją danych źródłowych w publicznych bazach danych transkryptomicznych i proteomicznych.

2. **Płociński P\***, Brissett NC, Bianchi J, Brzostek A, Korycka-Machała M, Dziembowski A, Dziadek J, **Doherty AJ#**. „DNA Ligase C and Prim-PolC participate in base excision repair in mycobacteria”. *Nature Communications*. 2017 Nov 1;8(1):1251. doi:10.1038/s41467-017-01365-y. **IF<sub>2017</sub>=12.353**; **MEiN<sub>2023</sub>=200**; liczba cytowań=17;

Jestem wiodącym autorem tej pracy. Większość badań przeprowadziłem w laboratorium Prof. Aidana Doherty, podczas 2-letniego stażu podoktorskiego, w ramach realizacji projektu Mobilność Plus III. Badania kontynuowałem po powrocie do Polski do Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi. W tej pracy mam przypisaną podwójną afiliację,

ponieważ badania w obu jednostkach prowadziłem w ramach umowy o pracę i podczas długoterminowego stażu podoktorskiego. Wraz z Prof. Doherty przygotowałem koncepcję badań, samodzielnie prowadziłem większość prac eksperymentalnych i koordynowałem prace eksperymentalne pozostałych członków zespołu. Odpowiadam za analizę i interpretację większości wyników przeprowadzonych badań, opracowanie materiału ilustracyjnego oraz znaczącej większości treści manuskryptu. Odpowiadałem również za przygotowanie odpowiedzi na recenzje pierwotnego manuskryptu, wraz z niezbędnymi uzupełnieniami eksperymentalnymi.

3. **Płociński P\***, Laubitz D\*, Cysewski D, Stodur K, Kowalska K, **Dziembowski A#**. „Identification of protein partners in mycobacteria using a single-step affinity purification method”. *PLoS One*. 2014 Mar. doi:10.1371/journal.pone.0091380. **IF<sub>2014</sub>=3.234; MEiN<sub>2023</sub>=140**; liczba cytowań=13;

Jestem wiodącym autorem tej pracy, wraz z dr hab. Danielem Laubitzem. Prace eksperymentalne były prowadzone w ramach dużego projektu europejskiego FP7-Health, zrzeszającego kilkunastu partnerów z całej Europy – wiodących naukowców w badaniach nad gruźlicą. Wraz z Prof. Dziembowskim i dr hab. Laubitzem przygotowałem koncepcję badań, z którym prowadziłem większość prac eksperymentalnych i koordynowałem prace eksperymentalne pozostałych członków zespołu. Odpowiadam za analizę i interpretację wyników przeprowadzonych badań, opracowanie materiału ilustracyjnego oraz istotnych fragmentów treści manuskryptu. Razem z dr hab. Laubitzem odpowiadałem również za przygotowanie odpowiedzi na recenzje pierwotnego manuskryptu, wraz z niezbędnymi uzupełnieniami eksperymentalnymi.

4. **Plocinski P\***, Martinez L, Sarva K, Plocinska R, Madiraju M, **Rajagopalan M#**. „*Mycobacterium tuberculosis* CwsA overproduction modulates cell division and cell wall synthesis”. *Tuberculosis* (Edinb). 2013 Dec;93 Suppl:S21-7. doi: 10.1016/S1472-9792(13)70006-4. **IF<sub>2013</sub>=3.503; MEiN<sub>2023</sub>=100**; liczba cytowań=13

Jestem wiodącym autorem tej pracy. Prace eksperymentalne rozpocząłem podczas stażu w laboratorium Prof. Rajagopalan, na Uniwersytecie Tekszańskim w Tyler i kontynuowałem po powrocie do kraju, w laboratoriach Prof. Dziembowskiego (IBB PAN

w Warszawie) oraz Prof. Dziadka (IBM PAN Łódź). Uczestniczyłem w opracowaniu koncepcji badań i przeprowadziłem większość prac eksperymentalnych, które doprowadziły do powstania powyższej publikacji naukowej. Uczestniczyłem w analizie danych i interpretacji wyników. Odpowiadam za opracowanie znacznej części materiału ilustracyjnego oraz istotnych fragmentów treści manuskryptu.

5. **Plocinski P\***, Arora N, Sarva K, Blaszczyk E, Qin H, Das N, Plocinska R, Ziolkiewicz M, Dziadek J, Kiran M, Gorla P, Cross TA, Madiraju M, **Rajagopalan M#**. „*Mycobacterium tuberculosis* CwsA interacts with CrgA and Wag31, and the CrgA-CwsA complex is involved in peptidoglycan synthesis and cell shape determination”. *Journal of Bacteriology*. 2012 doi: 10.1128/JB.0100512. Epub 2012 sep 21. IF2012=3.177; MEiN=140; liczba cytowań=49.

Jestem wiodącym autorem tej pracy. Podobnie jak w przypadku pracy opublikowanej na łamach *Tuberculosis*, prace eksperymentalne rozpocząłem podczas stażu w laboratorium Prof. Rajagopalan, na Uniwersytecie Teksańskim w Tyler i kontynuowałem po powrocie do kraju, w laboratoriach Prof. Dziembowskiego (IBB PAN w Warszawie) oraz Prof. Dziadka (IBM PAN Łódź). Uczestniczyłem w opracowaniu koncepcji badań i przeprowadziłem większość prac eksperymentalnych, które doprowadziły do powstania powyższej publikacji naukowej. Uczestniczyłem w analizie danych i interpretacji wyników. Odpowiadam za opracowanie znacznej części materiału ilustracyjnego oraz istotnych fragmentów treści manuskryptu.

*Legenda:* \*pierwszy autor/autorzy, #autor korespondujący.

Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor) publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi **IF=33,769**, suma punktów **MEiN=780** a sumaryczna **liczba cytowań=124** (120 bez autocytowań).

IF podane zgodnie z rokiem ukazania się publikacji na podstawie danych z bazy Web of Science (InCites Journal Citation Reports). Punkty MEiN podane zgodnie z ujednoliconym wykazem czasopism punktowanych ogłoszonym na rok/lata składania rozprawy

habilitacyjnej. Liczba cytowań (z uwzględnieniem autocytowań), według bazy Web of Science Core Collection, stan z dn. 4 sierpnia 2023 r.

## 4.3 Opis osiągnięcia naukowego

### 4.3.1 Cel naukowy cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe

**Celem pracy było zidentyfikowanie nieopisanych lub tylko częściowo opisanych kompleksów białkowych prątków z rodzaju *Mycobacterium* dla określenia ich roli w metabolizmie bakterii oraz ewaluacji ich użyteczności jako celów molekularnych dla planowania nowatorskich terapii przeciwprątkowych.**

### 4.3.2 Wprowadzenie

Główny przedmiot badań osiągnięcia naukowego stanowi *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, prątek gruźlicy), bakteria będąca czynnikiem etiologicznym gruźlicy. Ta groźna choroba zakaźna tylko w roku 2021 pozbawiła życia około 1,6 miliona ludzi na świecie. Jest szczególnie niebezpieczna dla osób cierpiących na niedobory odporności, jak AIDS, przez co prawie co szósta osoba, która w 2021 roku zmarła z powodu zakażenia gruźlicą, była nosicielem wirusa HIV (1). Przyjmuje się, że obecnie nawet 1/4 populacji ludzi na świecie może być zakażona prątkiem gruźlicy, ale u większości z tych osób (90-95%) nigdy nie rozwinie się objawowe zakażenie (2). Aktywna postać choroby pojawi się w ciągu życia u 5 do 10% nosicieli a jej wystąpienie często związane jest ze znacznym spadkiem odporności organizmu. Gruźlica przenosi się głównie drogą kropelkową, a najczęstsza postać choroby to gruźlica płuc (3). W trakcie infekcji, typowo, prątki gruźlicy są fagocytowane przez makrofagi alweolarne płuc i wzbudzają mechanizmy odpornościowe prowadzące do ograniczenia infekcji i utworzenia charakterystycznych skupisk komórek odpornościowych - ziarniniaków. Według danych Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, w roku 2021, w Polsce na gruźlicę zachorowało około 3704 osoby, co stanowiło 314 przypadków zachorowań więcej niż w roku 2020, kiedy to w wyniku gruźlicy zmarły 474 osoby, stanowiąc istotny odsetek zgonów z powodu wszystkich chorób zakaźnych i pasożytniczych (4). Sytuacja epidemiologiczna uległa pogorszeniu ze względu na współistniejącą w ostatnich latach

pandemię Covid-19, która spowodowała ograniczenia w dostępie do usług służby zdrowia i miała negatywny wpływ na diagnostykę i leczenie zakażeń prątkami gruźlicy.

Obecnie stosowana terapia przeciwprątkowa jest skuteczna przeciwko szczepom gruźlicy wrażliwym na tuberkulostatyki. Prowadzone zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc, leczenie pierwotnych zakażeń gruźlicy w Polsce obejmuje co najmniej 2-miesięczną fazę leczenia intensywnego przy zastosowaniu czterech z leków pierwszej linii leczenia: izoniazydu (INH), ryfampicyny (RMP), pirazynamidu (PZA) oraz etambutolu (EMB) lub streptomycyny (STR). Leczenie jest następnie kontynuowane przez co najmniej 4 kolejne miesiące przy zastosowaniu INH i RMP – faza kontynuacji leczenia (3).

Ostatnimi laty, globalnie, obserwuje się coraz częstsze pojawianie się szczepów gruźlicy leko- lub wielolekoopornej, co skłania naukowców na całym świecie do poszukiwania nowych leków przeciwgruźliczych oraz ewaluacji celów molekularnych w komórkach prątków, mogących posłużyć jako miejsca docelowe dla nowych chemioterapeutyków. Z drugiej strony, ważne jest wyjaśnienie mechanizmów powstawania lekooporności poprzez dokładną charakterystykę wewnątrzkomórkowych tarcz molekularnych dla obecnie stosowanych chemioterapeutyków przeciwprątkowych, jak również badania nad mutagennymi ścieżkami naprawy DNA wpływającymi na tempo nabywania lekooporności wśród populacji bakterii.

Dostępność pełnego genomu prątka gruźlicy (od 1998 roku (5)), związana z tym adnotacja białek tego patogenu, jak również postępy w badaniach proteomicznych i strukturalnych umożliwiły znaczący postęp w obszarze wyznaczenia nowych, potencjalnych miejsc docelowych dla nowoczesnych terapii przeciwprątkowych. Pierwszym krokiem w kierunku globalnej analizy potencjalnych celów molekularnych dla nowatorskich terapii przeciwprątkowych było określenie niezbędności genów *M. tuberculosis* dla przeżycia komórek prątków z wykorzystaniem mutagenyzy transpozonowej (6,7). Dzięki takim działaniom, w przeciągu ostatniego dziesięciolecia, nastąpił rozkwit badań nad nowatorskimi podejściami terapeutycznymi celowanymi w inaktywację białek niezbędnych dla przeżycia patogenu. Idealny cel molekularny dla leków powinien posiadać zdolność wiązania związków niskocząsteczkowych, przeciwciał lub rekombinowanych białek. Co ważne, badany komponent komórkowy powinien w istotny sposób różnić się od analogicznego białka/składnika procesu występującego w organizmie ludzkim, lub proces poddawany zahamowaniu z

wykorzystaniem leku powinien być całkowicie nieobecny u człowieka. Z tego powodu tak w przypadku mykobakterii, jak również innych patogenów bakteryjnych, za dobry cel terapeutyczny uznaje się m.in. mechanizmy zaangażowane w syntezę bakteryjnej ściany komórkowej.

Mechanizm działania większości obecnie stosowanych antybiotyków opiera się na zahamowaniu syntezy ściany komórkowej bakterii. Niestety, prątki gruźlicy charakteryzują się unikalną architekturą budowy ściany komórkowej i w tym zakresie znacząco różnią się od innych bakterii, przez co leczenie gruźlicy i innych mykobakterioz wymaga specjalistycznych i celowanych podejść terapeutycznych. Prowadzone przeze mnie badania nad kluczowymi kompleksami białkowymi prątków gruźlicy obejmowały badania nad kompleksem białek zaangażowanym w syntezę ściany komórkowej prątków (etap 1) oraz kompleksami uczestniczącymi w degradacji RNA i naprawach uszkodzeń DNA (etap 2).

### 4.3.3 Etap 1

#### **Cel badań podstawowych:**

Określenie wewnątrzkomórkowej funkcji nieopisanego wcześniej białka *M. tuberculosis*, kodowanego przez gen rv0008c, w kontekście jego prawdopodobnego udziału w procesie syntezy ściany komórkowej prątków i lekooporności.

#### **Zagadnienie praktyczne:**

Synteza ściany komórkowej jako miejsce docelowe dla terapii przeciwprątkowej.

Unikalna budowa ściany komórkowej prątków gruźlicy jest jednym z czynników zapewniających im naturalną oporność na wiele klasycznie stosowanych antybiotyków. Struktura ta zawiera charakterystyczne wielowęgłowe, rozgałęzione kwasy tłuszczowe, tzw. kwasy mykolowe. Są one odpowiedzialne za zmniejszoną przepuszczalność ściany komórkowej dla różnych substancji chemicznych, utrudniając penetrację antybiotyków i zmniejszając skuteczność terapii przeciwprątkowych. Struktury te biorą także udział w modelowaniu odpowiedzi immunologicznej człowieka jako czynniki wirulencji i sprzyjają przeżywaniu prątków wewnątrz komórek gospodarza. Ścieżka metaboliczna syntezy kwasów mykolowych jest obecnie wykorzystywana jako cel molekularny dla

izoniazydu, leku przeciwgruźliczego pierwszej linii leczenia, stosowanego rutynowo w leczeniu gruźlicy. Synteza ściany komórkowej i metabolizm kwasów mykoloowych są przez to oceniane jako jedne z najważniejszych celów terapeutycznych dla wynalezienia nowych terapii przeciwgruźliczych (8).

Synteza ściany komórkowej zachodzi w ściśle określonych miejscach w komórce prątków: podczas wzrostu wegetatywnego – na biegunach komórki, oraz podczas podziału komórki – w miejscu tworzenia przegrody podziałowej. Podział komórki i związane z nim wytwarzanie ściany komórkowej są procesami niezbędnymi dla przetrwania i namnażania się bakterii co zwiększa ich potencjał jako przydatne cele dla nowych leków przeciwprątkowych. Podział komórki prątków następuje podczas cyklu komórkowego tuż po replikacji chromosomu bakteryjnego i częściowo zająmuje się z jego segregacją do przeciwległych biegunów komórki. Proces tworzenia przegrody podziałowej jest możliwy dzięki obecności białka FtsZ, które należy do dynamicznych elementów cytoszkieletu bakteryjnego i posiada właściwości samoaktywującej się GTPazy. Białko FtsZ jest zdolne do tworzenia pierścienia podziałowego, umiejscawianego w centralnej części komórki gotowej do podziału, dzięki działaniu skomplikowanych mechanizmów regulacyjnych (9,10). Polimeryzacja FtsZ to proces dynamiczny, który można odtworzyć w warunkach *in vitro*, dodając GTP do oczyszczonego i odpowiednio zbuforowanego białka. Filamenty FtsZ są w komórce łączone w grupy by utworzyć strukturę podobną do pierścienia, znajdującego się tuż pod błoną komórki w jej centralnej części (11). Filamenty są stabilizowane i przymocowywane do membrany komórkowej poprzez białka kotwiczące i stabilizujące - u *Escherichia coli* (*E. coli*) FtsA i ZipA. Do powstającego pierścienia podziałowego przyłącza się kolejno kilkanaście innych białek tworząc kompleks zdolny do zsyntetyzowania przegrody poprzecznej, a następnie rozdzielenia nowopowstałych komórek potomnych poprzez hydrolizę nadmiaru ściany komórkowej pomiędzy nimi. Współistnienie dwóch przeciwstawnych procesów – syntezy i hydrolizy ściany komórkowej, wymaga ścisłego skoordynowania tych procesów, stąd białka wchodzące w skład kompleksu podziałowego są rekrutowane w odpowiedniej kolejności. Jakiegokolwiek zaburzenia tego procesu powodują niezdolność komórek bakteryjnych do namnażania się, a często śmierć poprzez lizę komórki (12).

U prątków z rodzaju *Mycobacterium*, podobnie jak u innych bakterii z rzędu *Actinomycetales*, nie odnajduje się bezpośrednich homologów wielu białek

zaangażowanych w podział komórki u prokariotycznych organizmów modelowych jak *E. coli* czy *Bacillus subtilis*. Nie identyfikuje się chociażby białek kotwiczących pierścieni FtsZ w błonie komórkowej i odpowiadających za jego stabilizację: FtsA i ZipA, czy białko ZapA. Nie obserwuje się również homologów z układu białek MinCDE odpowiedzialnych za prawidłowe pozycjonowanie pierścienia FtsZ w centralnej części komórki, czy białek destabilizujących polimery FtsZ - EzrA czy SulA. Prątki gruźlicy posiadają alternatywne, nieobecne u bakterii Gram-ujemnych czy Gram-dodatnich białka odpowiedzialne za koordynację procesu podziału komórki z replikacją chromosomu i syntezą ściany komórkowej przegrody podziałowej.

W pracy opublikowanej na łamach Journal of Bacteriology, dzięki zastosowaniu m.in. techniki bakteryjnego testu dwuhybrydowego (b2h), wykazałem, że białko CrgA z *M. tuberculosis* ma zdolność oddziaływania z FtsZ i jest elementem kompleksu podziałowego (z ang. divisome) (13). Odkrycie roli CrgA w komórkach prątków było tematem mojej rozprawy doktorskiej, do której badania prowadziłem na Uniwersytecie Tekszańskim w Tyler, w USA w grupie prof. Malini Rajagopalan. Z kolei identyfikacji roli CwsA w komórkach prątków, opisaną w pracy: [Plocinski P, Arora N, Sarva K, Blaszczyk E, Qin H, Das N, Plocinska R, Ziolkiewicz M, Dziadek J, Kiran M, Gorla P, Cross TA, Madiraju M, Rajagopalan M „Mycobacterium tuberculosis CwsA interacts with CrgA and Wag31, and the CrgA-CwsA complex is involved in peptidoglycan synthesis and cell shape determination”](#) na łamach Journal of Bacteriology, dokonałem we współpracy pomiędzy grupą Prof. Malini Rajagopalan z Uniwersytetu Tekszańskiego w Tyler oraz z laboratorium kierowanym przez Prof. Jarosława Dziadka w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Początkowo zaobserwowałem, że gen kodujący białko CwsA (*rv0008c*) znajduje się w genomie prątków gruźlicy, w sąsiedztwie genów dla innych białek zaangażowanych w procesy podziału komórki i syntezy elementów ściany komórkowej, wspomnianego CrgA, kompleksu polimerazy peptydoglikanu: PbpA i RodA oraz kinaz zaangażowanych w regulację procesu podziału komórki PknA i PknB. Sąsiedztwo w genomie oraz badania oddziaływań między białkami z wykorzystaniem technik b2h oraz techniki ko-precypitacji (z ang. pull-down) z użyciem rekombinowanych, oczyszczonych białek pozwoliło mi zidentyfikować oddziaływanie w komórce prątków pomiędzy białkami CrgA i CwsA. Dzięki badaniom oddziaływań między białkami, małe, posiadające domenę przezbłonową białko CwsA scharakteryzowałem w kontekście jego roli w komórkach

prątków, jako składnik kompleksu białkowego zaangażowanego w koordynację procesu podziału komórki i syntezy peptydoglikanu.



## *Mycobacterium tuberculosis* CwsA Interacts with CrgA and Wag31, and the CrgA-CwsA Complex Is Involved in Peptidoglycan Synthesis and Cell Shape Determination

P. Plocinski,<sup>a\*</sup> N. Arora,<sup>a</sup> K. Sarva,<sup>a</sup> E. Blaszczyk,<sup>a</sup> H. Qin,<sup>c</sup> N. Das,<sup>c</sup> R. Plocinska,<sup>a\*</sup> M. Ziolkiewicz,<sup>b</sup> J. Dziadek,<sup>b</sup> M. Kiran,<sup>a</sup> P. Gorla,<sup>a</sup> T. A. Cross,<sup>c</sup> M. Madiraju,<sup>a</sup> and M. Rajagopalan<sup>a</sup>

The University of Texas Health Science Center at Tyler, Biomedical Research, Tyler, Texas, USA<sup>a</sup>; Institute of Medical Biology, Polish Academy of Sciences, Lodz, Poland<sup>b</sup>; and The National High Magnetic Field Lab and the Department of Chemistry and Biochemistry, Florida State University, Tallahassee, Florida, USA<sup>c</sup>

Bacterial cell division and cell wall synthesis are highly coordinated processes involving multiple proteins. Here, we show that Rv0008c, a novel small membrane protein from *Mycobacterium tuberculosis*, localizes to the poles and on membranes and shows an overall punctate localization throughout the cell. Furthermore, Rv0008c interacts with two proteins, CrgA and Wag31, implicated in peptidoglycan (PG) synthesis in mycobacteria. Deletion of the Rv0008c homolog in *M. smegmatis*, MSMEG\_0023, caused bulged cell poles, formation of rounded cells, and defects in polar localization of Wag31 and cell wall synthesis, with cell wall synthesis measured by the

Tuberculosis 93 S1 (2013) S21–S27



Contents lists available at ScienceDirect

Tuberculosis

journal homepage: <http://intl.elsevierhealth.com/journals/tube>



## *Mycobacterium tuberculosis* CwsA overproduction modulates cell division and cell wall synthesis

P. Plocinski<sup>a</sup>, L. Martinez<sup>a</sup>, K. Sarva<sup>a</sup>, R. Plocinska<sup>a</sup>, M. Madiraju<sup>a</sup> and M. Rajagopalan<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Biomedical Research, The University of Texas Health Science Center @ Tyler, Tyler, TX 75708, USA

### KEYWORDS

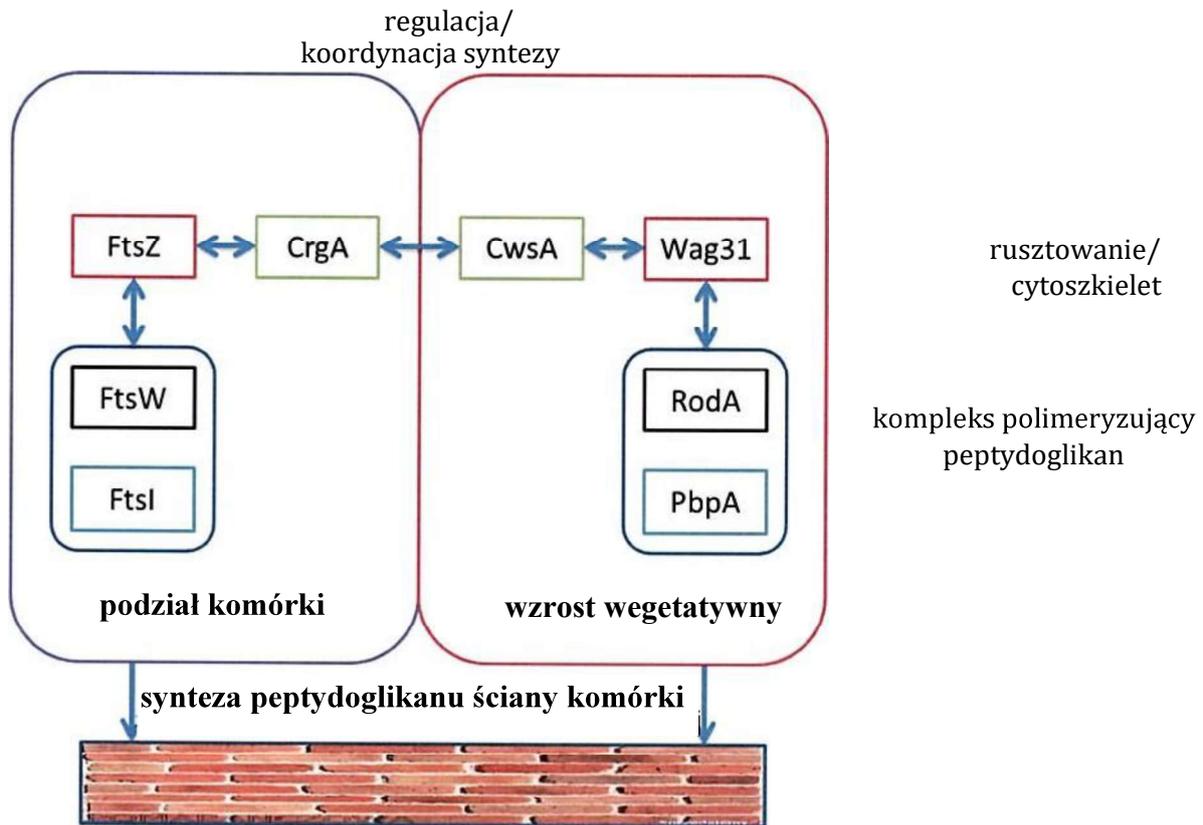
*Mycobacterium*  
FtsZ  
CwsA  
Cell wall synthesis  
Cell division

### ABSTRACT

We recently showed that two small membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*, CwsA and CrgA, interact with each other, and that loss of CwsA in *M. smegmatis* is associated with defects in the cell division and cell wall synthesis processes. Here we show that CwsA overproduction also affected growth, cell division and cell shape of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*. CwsA overproduction in *M. tuberculosis* led to increased sensitivity to cefsulodin, a penicillin-binding protein (PBP) 1A/1B

Przy zastosowaniu b2h wykazałem, iż białko CwsA ma również zdolność do oddziaływania z białkiem Wag31, stanowiącym rusztowanie dla maszynerii prowadzącej syntezę peptydoglikanu na biegunach komórki prątków. Obydwa białka wykazywały także zdolność do lokalizacji na biegunach komórki, a usunięcie z komórki CwsA prowadziło do destabilizacji struktur tworzonych przez Wag31.

Kontynuując badania nad CwsA zaobserwowałem że nadprodukcja, jak i usunięcie z komórek prątków białka CwsA, powodowało widoczne pod mikroskopem zaburzenia w morfologii komórek, które częściej przybierały kształt rozdęty, zamiast utrzymywać kształt pałeczkowaty. Z drugiej strony, nadprodukcja CwsA w *E. coli* prowadziła do całkowitej utraty kształtu pałeczkowatego przez te bakterie, przekształcające się w komórki koliste, które ostatecznie podlegały pęknięciu i lizie. Obserwacja ta stała się podstawą do podjęcia badań opisanych w pracy opublikowanej na łamach czasopisma *Tuberculosis*: [Plocinski P, Martinez L, Sarva K, Plocinska R, Madiraju M, Rajagopalan M. „Mycobacterium tuberculosis CwsA overproduction modulates cell division and cell wall synthesis”](#). Co ważne, nadprodukcja CwsA wiązała się z uwrażliwieniem prątków na działanie cefalosporyny III generacji – cefsulodyny, mierząc strefę zahamowania wzrostu bakterii metodą dyfuzyjno-krażkową. Według danych literaturowych, cefsulodyna wykazuje najsilniejsze powinowactwo do białek z grupy Pbp 1A/1B (z ang. Penicillin binding protein 1A/1B), uczestniczących w syntezie peptydoglikanu podczas wzrostu komórki bakteryjnej. Jednocześnie, wrażliwość komórek prątków na cefaleksynę, wankomycynę, cefoksytynę, imipenem oraz D-cykloserynę pozostała niezmienną, co świadczy o specyficznym zahamowaniu jednego konkretnego procesu w komórce, związanego z aktywnością CwsA. Ponieważ gen kodujący CwsA znajduje się w genomie prątków, w sąsiedztwie operonu kodującego PbpA i RodA – białka tworzące kompleks białkowy zaangażowany w syntezę peptydoglikanu, jest wysoce prawdopodobne, że białka te wraz z CwsA i Wag31 biorą udział w tym samym procesie w komórce. Wzajemne zależności między systemem syntezy peptydoglikanu ściany komórkowej *Mycobacterium* związanym z wydłużaniem komórki prątków a syntezą przegrody podziałowej ilustruje Rycina 1.



**Rycina 1.** Rola CwsA w regulacji procesu syntezy peptydoglikanu ściany komórkowej prątków gruźlicy. Rozwinięcie skrótów: z ang. *CwsA* – cell wall synthesis protein A, *Pbp* – penicillin binding protein, *fts* – filamenting temperature-sensitive proteins, *crgA* – coordinating reproductive growth protein A

### Najważniejsze osiągnięcia etapu pierwszego:

1. Odkrycie i scharakteryzowanie białka Rv0008c, odtąd opisywanego jako CwsA (z ang. cell wall synthesis protein A) jako białka związanego z syntezą ściany komórkowej prątków gruźlicy
2. Wykazanie oddziaływań białka CwsA z białkiem strukturalnym Wag31 i wykazanie bezpośredniego wpływu CwsA na kompleks polimerazy peptydoglikanu
3. Wykazanie zmian w profilu antybiotykooporności prątków gruźlicy w przypadku zaburzeń wewnątrzkomórkowego poziomu białka CwsA, z widocznym uwrażliwieniem prątków na cefsulodynę przy nadprodukcji CwsA.

**Możliwe zastosowania praktyczne:**

Bakteryjne białka zaangażowane w procesy podziału komórki oraz syntezy ściany komórkowej są upatrywane jako dobre cele terapeutyczne. Pełne zrozumienie mechanizmów związanych z regulacją procesu podziału komórki i syntezy ściany komórkowej może pozwolić na zaprojektowanie strategii do skutecznego leczenia infekcji wywołanych przez prątki. Niedawno opisana substancja chemiczna o skutecznym działaniu przeciwpłatkowym APYS1 jest podejrzewana o zaburzenie oddziaływań między Wag31 a CwsA, jako mechanizm prowadzący do silnych zmian morfologicznych dotyczących biegun wzrostu komórki prątków co ostatecznie prowadzi do lizy komórek (14). Obserwowane tu zmiany fenotypowe są bardzo podobne do tych obserwowanych przy nadprodukcji CwsA.

**4.3.4 Etap 2****Cel badań podstawowych:**

Określenie funkcji komórkowych wybranych kompleksów białkowych biorących udział w metabolizmie kwasów nukleinowych, w kontekście syntezy i degradacji RNA oraz naprawy uszkodzeń DNA u prątków gruźlicy.

**Zagadnienie praktyczne:**

Elementy metabolizmu kwasów nukleinowych prątków gruźlicy jako cele molekularne dla leków przeciwbakteryjnych.

Mykobakterie, tak jak inne organizmy, aby przeżyć muszą powielać swój materiał genetyczny w procesie replikacji DNA, przepisywać swój materiał genetyczny z DNA do RNA, w procesie transkrypcji, a potem z RNA do białek, podczas translacji. Podstawowe zasady przebiegu tych mechanizmów są takie same u wszystkich żywych organizmów komórkowych. Na poziomie molekularnym, można jednak znaleźć znaczące różnice między np. bakteriami i komórkami eukariotycznymi, co daje szansę na zastosowanie chemioterapeutyków blokujących te kluczowe dla przeżycia procesy specyficznie tylko u bakterii, nie wpływając w istotny sposób na komórki naszego organizmu. Obecnie stosuje się np. różnorodne antybiotyki wpływające na proces translacji RNA do białek u bakterii, dając szansę na opanowanie infekcji i eradykację drobnoustrojów

powodujących chorobę. Podczas cyklu życiowego, każda komórka bakteryjna musi wyprodukować i przetworzyć ogromne ilości cząsteczek RNA. Za syntezę RNA w komórce odpowiada DNA-zależna polimeraza RNA, stanowiąca wieloskładnikowy kompleks białkowy, mający zdolność do wiązania DNA. Ryfampicyna, lek należący do pierwszej linii leczenia w przypadku zakażeń prątkami gruźlicy i prątkami trądu, ma zdolność do wybiórczego blokowania podjednostki beta polimerazy RNA prątków – białka RpoB. Mutacje w obrębie genu kodującego RpoB są odpowiedzialne za nabywanie przez prątki oporności na ryfampicynę. Badania naukowe tak nad metabolizmem RNA, jak i mechanizmami nabywania lekooporności, są ważne z punktu widzenia leczenia gruźlicy na świecie.

W pracy z 2014 roku Płociński P, Laubitz D, Cysewski D, Stodur K, Kowalska K, Dziembowski A. „Identification of protein partners in mycobacteria using a single-step affinity purification method” z *PloS One*, będącej częścią osiągnięcia naukowego została zoptymalizowana metoda identyfikacji oddziaływań między białkami poprzez oczyszczanie kompleksów białkowych z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa sprzężonej ze spektrometrią mas. Badania prowadziłem podczas mojego zatrudnienia w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN, w grupie Prof. Dziembowskiego, w ramach współpracy wielośrodkowej w projekcie „SystemTB” FP7-Health, ufundowanym przez komisję europejską.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

## Identification of Protein Partners in Mycobacteria Using a Single-Step Affinity Purification Method



Przemysław Płociński<sup>1,2</sup>, Daniel Laubitz<sup>1,2</sup>, Dominik Cysewski<sup>1</sup>, Krystian Stodur<sup>1</sup>, Katarzyna Kowalska<sup>1</sup>, Andrzej Dziembowski<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warszawa, Poland, <sup>2</sup> Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Warsaw, Poland

### Abstract

Tuberculosis is a leading cause of death in developing countries. Efforts are being made to both prevent its spread and improve curability rates. Understanding the biology of the bacteria causing the disease, *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), is thus vital. We have implemented improved screening methods for protein–protein interactions based on affinity purification followed by high-resolution mass spectrometry. This method can be efficiently applied to both medium- and high-throughput studies aiming to characterize protein–protein interaction networks of tubercle bacilli. Of the 4 tested epitopes FLAG, enhanced green fluorescent protein (eGFP), protein A and haemagglutinin, the eGFP tag was found to be most useful on account of its easily monitored expression and its ability to function as a simultaneous tool for subcellular

Jednym z analizowanych w pracy kompleksów białkowych był kompleks DNA-zależnej polimerazy RNA. Metodę optymalizowano na modelu *Mycobacterium smegmatis* (obecnie przemianowanej na *Mycolicibacterium smegmatis*), bakterii saprofitycznej, spokrewnionej z prątkiem gruźlicy, używanej często jako model do badania wybranych procesów komórkowych u prątków; oraz na modelu *M. bovis* BCG, laboratoryjnym szczepie prątków gruźlicy bydłowej. Przetestowano cztery różne znaczniki dołączane do analizowanych białek jako białka fuzyjne, umożliwiające dalsze oczyszczanie kompleksów białkowych na złożach opłaszczonych specyficznymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko epitopom białek znaczników. Spośród zastosowanych znaczników: FLAG, eGFP (z ang. enhanced Green Fluorescent Protein, białko zielonej fluorescencji), hemaglutyniny oraz białka A, eGFP zostało wybrane jako optymalny znacznik, który umożliwiał izolację znaczących ilości kompleksów białkowych, przy niskim poziomie zanieczyszczeń i niskim koszcie przygotowania złoża do chromatografii powinowactwa. Jako białko – przynętę, do oczyszczenia kompleksu polimerazy RNA, wykorzystano białko RpoA. Ze względu na fakt, iż fuzja z dużych rozmiarów znacznikiem -białkiem eGFP, mogłaby zaburzyć fałdowanie lub funkcjonalność RpoA, sprawdzono jego lokalizację w komórce. Zgodnie z naturalną zdolnością do wiązania DNA, ko-lokalizowało ono do chromosomu bakteryjnego. W związku z tym wykorzystanie znacznika eGFP nie tylko pozwalało na efektywne oczyszczanie kompleksów białkowych z komórek prątków, ale także do jednoczesnej wizualizacji ich lokalizacji wewnątrz komórek. Zastosowana metoda pozwoliła na oczyszczenie istotnych ilości kompleksu DNA-zależnej polimerazy RNA i charakterystykę oddziaływań między poszczególnymi płaszczyznami białek kompleksu dzięki zastosowaniu związków sieciujących i mapowania sieciowań na podstawie wyników spektrometrii mas.

Czas półtrwania cząsteczek RNA jest bardzo krótki – średnio kilka sekund, i wszystkie uszkodzone, błędnie zsyntetyzowane lub niepotrzebne cząsteczki RNA muszą zostać usunięte z komórki aby umożliwić jej wzrost i zapewnić żywotność (15). Za proces oczyszczania komórek z niechcianego lub niepotrzebnego RNA jest odpowiedzialny kompleks degradosomu RNA. Kompleks degradosomu bierze udział również w dojrzewaniu cząsteczek RNA, regulacji przydatności mRNA do translacji, regulacji poziomu transkryptów przez małe niekodujące RNA, antysensowne RNA oraz aktywację/inaktywację rybobrzełaczowników czy antyterminatorów transkrypcji. Upośledzenie procesów dojrzewania i niszczenia RNA może mieć poważne

konsekwencje dla przeżycia komórki i zablokowanie tych procesów często prowadzi do ich śmierci. Eliminacja i recykling składników budulcowych RNA jest również kluczowy dla procesów adaptacyjnych, kiedy to globalne zmiany w profilach RNA są konieczne dla nabycia nowych właściwości czy funkcji przez komórki bakteryjne. Mechanizmy adaptacji są uważane za jeden z głównych środków umożliwiających przejście prątków gruźlicy w stan życia utajonego podczas uśpionej formy zakażenia, oraz reaktywacji do formy aktywnie namnażającej się przy wystąpieniu aktywnej postaci gruźlicy.

W ostatnim czasie, została opublikowana praca opisująca identyfikację związku niskocząsteczkowego, blokującego aktywność jednej z dwóch kluczowych rybonukleaz prątków – RNazy E. Co ważniejsze, druga niezbędna rybonukleaza zaangażowana w degradację RNA u mykobakterii – białko PNP (z ang. polynucleotide phosphorylase), została niedawno opisana jako cel molekularny dla kwasu pirazyнового, aktywnego metabolitu pirazynamidu. Zostały jednocześnie scharakteryzowane mutacje w obrębie genu kodującego białko PNP, odpowiedzialne za nabywanie przez prątki oporności na pirazynamid (16). Wykorzystując opisaną wcześniej metodologię oczyszczania kompleksów białkowych z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa sprzężonej ze spektrometrią mas, w pracy z 2019 roku: [Płociński P, Macios M, Houghton J, Niemiec E, Płocińska R, Brzostek A, Słomka M, Dziadek J, Young D, Dziembowski A. „Proteomic and transcriptomic experiments reveal an essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of \*Mycobacterium tuberculosis\*”](#), opublikowanej na łamach prestiżowego pisma *Nucleic Acids Research*, kierowałem identyfikacją kompleksu degradosomu RNA u prątków gruźlicy.

5892–5905 *Nucleic Acids Research*, 2019, Vol. 47, No. 11  
doi: 10.1093/nar/gkz251

Published online 8 April 2019

## Proteomic and transcriptomic experiments reveal an essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*

Przemysław Płociński<sup>1,2,3,\*</sup>, Maria Macios<sup>1</sup>, Joanna Houghton<sup>2</sup>, Emilia Niemiec<sup>1</sup>,  
Renata Płocińska<sup>3</sup>, Anna Brzostek<sup>3</sup>, Marcin Słomka<sup>4</sup>, Jarosław Dziadek<sup>3</sup>, Douglas Young<sup>2</sup>  
and Andrzej Dziembowski<sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Pawińskiego 5A, Warsaw 02-106, Poland, <sup>2</sup>Mill Hill Laboratory, Francis Crick Institute, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, UK, <sup>3</sup>Institute of Medical Biology, Polish Academy of Sciences, Lodowa 106, Łódź 93-232, Poland, <sup>4</sup>Biobank Lab, Department of Molecular Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Piłarskiego 14/16, Łódź 90-231, Poland and <sup>5</sup>Institute of Genetics and Biotechnology, University of Warsaw, Pawińskiego 5A, Warsaw 02-106, Poland

Received December 06, 2018; Revised March 25, 2019; Editorial Decision March 26, 2019; Accepted April 02, 2019

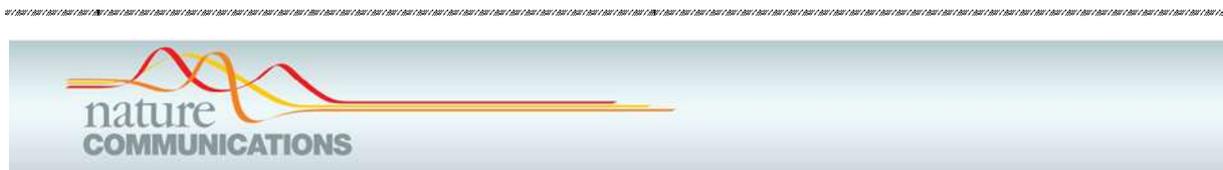
W badaniach, wraz z zespołem ustaliliśmy skład rdzenia degradosomu u *M. tuberculosis*, który tworzą dwie nukleazy mające zdolność do specyficznego cięcia cząsteczek RNA: RNaza E i PNP; oraz enzym umożliwiający rozplatanie RNA - helikaza RhlE. Ponadto, w skład kompleksu degradosomu RNA wchodziła kolejna rybonukleaza – RNaza J oraz dwa białka opiekuńcze CspA, CspB, wpływające na fałdowanie struktur tworzonych przez cząsteczki RNA. Oprócz pokazania po raz pierwszy składu kompleksu białkowego degradosomu RNA, na potrzeby wspomnianej pracy opracowaliśmy nowatorską metodę analizy kompleksów białko – RNA. Ponieważ mRNA mykobakterii tylko w nieznacznym stopniu ulega poliadenylacji, dostępne metody użyteczne dla globalnych analizy białek wiążących RNA, oparte o chromatografię powinowactwa poliadenylowanego RNA do złożów opłaszczonych oligo-poly-dT, są w przypadku prątków gruźlicy mało pomocne. Jako alternatywę, wykorzystaliśmy zdolność prątków do inkorporacji do RNA foto-aktywowanego analogu rybonukleotydu – 4-tio-urydyny. Nukleotyd ten był transportowany do wnętrza komórki prątków *M. bovis* i wbudowywany do RNA przez DNA-zależną polimerazę RNA. Po naświetleniu komórek światłem UV o długości fali 365nm, powodującej foto-wzbudzenie tio-urydyny, powstawały wiązania kowalencyjne między cząsteczkami RNA a wiążącymi je białkami. Następnie kompleksy RNA-białko były oczyszczane przy użyciu chromatografii powinowactwa na kolumnie jonowymiennej, a odzyskiwane z nich białka były trawione

trypsyną i analizowane z wykorzystaniem spektrometru mas. Co istotne, w wyniku takich eksperymentów pokazaliśmy, że składniki degradosomu RNA, RNaza E, RNaza J, PNP i RhIE oddziałują z RNA w komórkach *in vivo*, gdyż spektra masowe były zdominowane przez peptydy mapowane do tych białek. Ponadto, w przytoczonej pracy, przy zastosowaniu technik masowego sekwencjonowania RNA-Seq, z wykorzystaniem technologii Illumina, wskazałem pulę cząsteczek RNA w komórce, których poziom ulega zmianie w przypadku zaburzenia ilości składników degradosomu, w szczepach z warunkową produkcją RNazy E lub PNP, regulowanych przez mykobakteryjny system Cas9/CRISPR. Większość opisanych tu prac eksperymentalnych była przeze mnie prowadzona w trzech współpracujących ośrodkach: 1) w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, w Warszawie, 2) w Narodowym Instytucie Badań Medycznych w Londynie, w Wielkiej Brytanii i 3) w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Wykorzystanie unikalnej infrastruktury i wiedzy eksperckiej dostępnej w poszczególnych zespołach umożliwiło udokumentowanie składu i funkcji w komórce kompleksu degradosomu RNA prątków gruźlicy. Jest to niezwykle ważne w kontekście wykorzystania elementów tworzących degradosom RNA dla planowania przyszłych strategii przeciwpątkowych, oraz zrozumienia aktywności przeciwpątkowej pirazynamidu, leku pierwszej linii leczenia stosowanego w leczeniu gruźlicy.

Analiza kompleksów białkowych z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa sprzężonej ze spektrometrią mas, okazała się niezwykle pomocna również w przypadku badania procesów napraw uszkodzeń DNA. Procesy te są w bezpośredni sposób powiązane z mechanizmami odpowiedzialnymi za zmienność genetyczną, mutagenezę i nabywanie lekooporności przez bakterie. W przytoczonej wcześniej pracy w Plos One z 2014 roku, wykorzystaliśmy elementy systemu napraw DNA poprzez wycinanie uszkodzonych nukleotydów (z ang. *NER, nucleotide excision repair*), do śledzenia procesu napraw uszkodzeń DNA w czasie rzeczywistym. Używając białka UvrA w fuzji z eGFP jako przynęty, nadprodukowanego w komórkach prątków *M. bovis*, potwierdziłem, że w warunkach normalnego wzrostu tworzy ono kompleks z białkiem UvrB, powszechnie opisywany jako kompleks skanujący integralność DNA. Po indukcji uszkodzeń DNA, przy zastosowaniu ekspozycji prątków na światło UV o długości fali 254nm, już w 5 minut po indukcji uszkodzenia obserwowano dysocjację kompleksu skanującego, a jego odtworzenie następowało pomiędzy 15 a 30 minut od indukcji uszkodzenia. Zastosowana technika pozwoliła na śledzenie dynamicznych zmian składu

kompleksów białkowych w trakcie spełniania przez nie ich fizjologicznych funkcji w procesach biologicznych w czasie rzeczywistym.

Opisywana tu technika badania oddziaływań między białkami okazała się również niezwykle cenna dla określenia funkcji białek z operonu LigC – Prim-PolC w procesach napraw DNA w komórkach prątków w pracy Płociński P, Brissett NC, Bianchi J, Brzostek A, Korycka-Machała M, Dziembowski A, Dziadek J, Doherty AJ, „DNA Ligase C and Prim-PolC participate in base excision repair in mycobacteria”. Na łamach prestiżowego czasopisma Nature Communications po raz pierwszy udokumentowaliśmy zaangażowanie ATP-zależnej ligazy DNA – LigC i związanej z nią genetycznie prymazy/polimerazy z rodziny enzymów AEP (z *ang.* archaeo-eukaryotic primase/polymerase) w szlaki napraw wycinania uszkodzonych zasad azotowych – BER (z *ang.* base excision repair).



ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-017-01365-y

OPEN

## DNA Ligase C and Prim-PolC participate in base excision repair in mycobacteria

Przemysław Płociński<sup>1,2</sup>, Nigel C. Brissett<sup>1</sup>, Julie Bianchi<sup>1,4</sup>, Anna Brzostek<sup>2</sup>, Małgorzata Korycka-Machała<sup>2</sup>, Andrzej Dziembowski<sup>3</sup>, Jarosław Dziadek<sup>2</sup> & Aidan J. Doherty<sup>1</sup>

Prokaryotic Ligase D is a conserved DNA repair apparatus processing DNA double-strand breaks in stationary phase. An orthologous Ligase C (LigC) complex also co-exists in many

W przytoczonej pracy zidentyfikowano oddziaływania między ligazą LigC a Prim-PolC oraz elementami systemu BER – endonukleazą IV, dwoma paralogami egzonukleazy III (ExoIII oraz XthA) oraz glikozylazami FPG i MPG. W badaniach określono również specyficzność substratową Prim-PolC i LigC przy zastosowaniu testów retardacji DNA w żelu poliakrylamidowym (technika EMSA), oraz w testach aktywności –odpowiednio wydłużania i ligacji DNA z wykorzystaniem jako substratów krótkich dwuniciowych

fragmentów oligonukleotydowych imitujących produkty pośrednie napraw BER. Do badań oczyściłem szereg białek w postaci rekombinowanej, co pozwoliło na odtworzenie pełnego szlaku napraw uszkodzeń w warunkach *in vitro*. Substraty oligonukleotydowe zawierające w centralnej części produkt oksydacyjnego uszkodzenia guaniny – 8-oksyguaninę były inkubowane w obecności glikozylazy FPG, a następnie endonukleazy IV (względnie egzonukleazy III) oraz Prim-PolC i LigC. W wyniku działania rekombinowanych enzymów następowała całkowita naprawa uszkodzenia z wycięciem uszkodzonego nukleotydu, defosforylacją końca 3' uszkodzenia, wypełnieniem go przez aktywność polimerazową Prim-PolC oraz ligacja i odtworzenie ciągłości nici naprawianego DNA. Dla pełniejszej charakterystyki badanego szlaku napraw DNA, podjąłem próbę krystalizacji białka Prim-PolC. Rekombinowane białko Prim-PolC oczyściłem metodami chromatografii powinowactwa, początkowo na złożu niklowym wiążącym ogon poli-histydynowy rekombinowanego Prim-PolC, następnie na kolumnie jonowymiennej, a docelowo na kolumnie filtracji żelowej. Wysoce oczyszczone białko miało zdolność do tworzenia kryształów w kilku warunkach spośród kilkuset przetestowanych, w tym w jednym przypadku w warunkach stosowanych do krystalizacji kwasów nukleinowych z białkami. Ostatecznie uzyskaliśmy kryształy o dobrych parametrach rozpraszania i rozwiązaliśmy strukturę krystaliczną zarówno apoenzymu Prim-PolC jak i białka w kompleksie z DNA, co jest niezwykle ważne dla pełnego zrozumienia jego funkcji w komórce. Badania strukturalne są nieocenione przy planowaniu swoistych inhibitorów dla enzymów, np. takich, które mogłyby skutecznie blokować aktywność mykobakteryjnych enzymów z rodziny AEP. *M. tuberculosis* koduje informację genetyczną dla czterech takich enzymów, dodatkowo wprowadzających mutacje genetyczne do genomu z wysoką częstością a więc wpływających na zmienność genetyczną populacji prątków i na tempo nabywania oporności na antybiotyki.

Przedstawione w ramach osiągnięcia naukowego prace wnoszą istotną wiedzę na temat kilku kluczowych dla przetrwania i namnażania się patogenu – prątka gruźlicy – kompleksów białkowych, oraz oddziaływań białko – kwasy nukleinowe.

#### Najważniejsze osiągnięcia etapu drugiego:

1. Odkrycie i scharakteryzowanie kompleksu białek degradosomu RNA, niezbędnego dla prawidłowego metabolizmu RNA w komórkach prątków,

2. Wskazanie puli transkryptów w komórkach prątków o zmienionym poziomie ekspresji przy zaburzeniu ilości niezbędnych białek degradosomu RNA,
3. Odkrycie i opisanie roli białek LigC i Prim-PolC w procesie naprawy DNA prątków kwasoodpornych, jako nowego odgałęzienia szlaku napraw DNA poprzez wycinanie uszkodzonych zasad azotowych,
4. Rozwiązanie struktury krystalicznej białka Prim-PolC jako apoenzymu i w kompleksie z DNA.

### Możliwe zastosowania praktyczne:

Białka PNP i RNaza E są bezwzględnie niezbędne dla przeżycia komórek prątków i są uważane jako dobre cele terapeutyczne dla planowania przyszłych terapii przeciwprątkowych. Opisane tu badania przyczyniają się do zrozumienia ich funkcji w komórkach prątków ale także do dokładniejszego zrozumienia mechanizmu działania leku przeciwprątkowego pierwszej linii leczenia – pirazynamidu, dla którego celem molekularnym w komórce mykobakterii jest białko PNP. Wyniki przedstawionych prac dostarczają także nowatorskich metodologii przydatnych przy charakteryzowaniu oddziaływań białko-białko jak również białko-RNA, które mogą być zastosowane w pracach nie tylko na prątkach gruźlicy, ale też innych organizmach. Prace nad białkiem Prim-PolC mogą umożliwić planowanie podejść terapeutycznych mających na celu zablokowanie aktywności prymaz/polimeraz z grupy AEP u prątków, jako nowatorskich terapii przeciwgruźliczych.

### Wsparcie finansowe:

1. 2015/19/D/NZ1/02842, SONATA 10, „Udział białek rdzenia degradosomu RNA w regulacji metabolizmu prątków gruźlicy” na kwotę 672 300 zł, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, realizowany w Instytucie Biologii Medycznej PAN w latach 2016 a 2019, **jako kierownik projektu**, projekt zakończony.
2. 1073/MOB/2013/0 „Rola bakteryjnych prymaz typu AEP oraz ligaz DNA w naprawie DNA u prątków z rodzaju *Mycobacterium*”, **jako kierownik projektu**, Mobilność Plus III, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, projekt zakończony

### 4.3.5 Podsumowanie

Wszystkie przedstawione w ramach osiągnięcia naukowego publikacje etapu pierwszego i etapu drugiego ukazują eksperymenty, które przyczyniły się w sposób znaczący do wyjaśnienia roli badanych składników kompleksów białkowych i kompleksów białko-kwas nukleinowy w fizjologii mykobakterii. W prezentowanych pracach zwrócono szczególną uwagę na rozwój metodologii badawczych pomocnych przy ewaluacji użyteczności badanych białek jako celów molekularnych dla planowania nowatorskich terapii przeciwprątkowych. Prezentowane prace pomagają również zrozumieć naturę i źródła mechanizmów biorących udział w adaptacji bakterii do zmieniających się warunków środowiska wzrostu i bytowania, w tym nabywania oporności na antybiotyki. W dalszej perspektywie, prowadzone badania pomogą w zaplanowaniu nowoczesnych podejść terapeutycznych, lub pomogą wyjaśnić mechanizmy działania obecnie używanych lub testowanych substancji przeciwprątkowych, dla ograniczenia nosicielstwa *Mycobacterium tuberculosis* u milionów ludzi na świecie.

#### Bibliografia:

1. WHO. (2023) WHO global tuberculosis report. World Health Organization.
2. Gideon, H.P. and Flynn, J.L. (2011) Latent tuberculosis: what the host "sees"? Immunologic research, 50, 202-212.
3. Augustynowicz-Kopec, E., Demkow, U., Grzelewska-Rzymowska, I., Korzeniewska-Kosela, M., Langfort, R., Michalowska-Mitczuk, D., Rowinska-Zakrzewska, E., Zielonka, T.M., Ziolkowski, J. and Zwolska, Z. (2013) [Guidelines of Polish Respiratory Society concerning diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis in adults and in child]. Pneumonologia i alergologia polska, 81, 325-379.
4. (2023) Biuletyn Informacji Publicznej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.
5. Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature, 393, 537-544.
6. DeJesus, M.A., Gerrick, E.R., Xu, W., Park, S.W., Long, J.E., Boutte, C.C., Rubin, E.J., Schnappinger, D., Ehrt, S., Fortune, S.M. et al. (2017) Comprehensive Essentiality Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Genome via Saturating Transposon Mutagenesis. mBio, 8.
7. Griffin, J.E., Gawronski, J.D., DeJesus, M.A., Ioerger, T.R., Akerley, B.J. and Sasseti, C.M. (2011) High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. PLoS pathogens, 7, e1002251.
8. North, E.J., Jackson, M. and Lee, R.E. (2014) New approaches to target the mycolic acid biosynthesis pathway for the development of tuberculosis therapeutics. Current pharmaceutical design, 20, 4357-4378.

9. Dziadek, J., Madiraju, M.V., Rutherford, S.A., Atkinson, M.A. and Rajagopalan, M. (2002) Physiological consequences associated with overproduction of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ in mycobacterial hosts. *Microbiology*, 148, 961-971.
10. Dziadek, J., Rutherford, S.A., Madiraju, M.V., Atkinson, M.A. and Rajagopalan, M. (2003) Conditional expression of *Mycobacterium smegmatis* ftsZ, an essential cell division gene. *Microbiology*, 149, 1593-1603.
11. Adams, D.W. and Errington, J. (2009) Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature reviews. Microbiology*, 7, 642-653.
12. Hett, E.C. and Rubin, E.J. (2008) Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 72, 126-156, table of contents.
13. Plocinski, P., Ziolkiewicz, M., Kiran, M., Vadrevu, S.I., Nguyen, H.B., Hugonnet, J., Veckerle, C., Arthur, M., Dziadek, J., Cross, T.A. et al. (2011) Characterization of CrgA, a new partner of the *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycan polymerization complexes. *Journal of bacteriology*, 193, 3246-3256.
14. Singh, V., Dhar, N., Pato, J., Kolly, G.S., Kordulakova, J., Forbak, M., Evans, J.C., Szekely, R., Rybniker, J., Palcekova, Z. et al. (2017) Identification of aminopyrimidine-sulfonamides as potent modulators of Wag31-mediated cell elongation in mycobacteria. *Molecular microbiology*, 103, 13-25.
15. Galagan, J.E., Minch, K., Peterson, M., Lyubetskaya, A., Azizi, E., Sweet, L., Gomes, A., Rustad, T., Dolganov, G., Glotova, I. et al. (2013) The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia. *Nature*, 499, 178-183.
16. Njire, M., Wang, N., Wang, B., Tan, Y., Cai, X., Liu, Y., Mugweru, J., Guo, J., Hameed, H.M.A., Tan, S. et al. (2017) Pyrazinoic Acid Inhibits a Bifunctional Enzyme in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61.

#### 4.3.7 Opis pozostałych osiągnięć naukowych lub artystycznych

##### **Przed uzyskaniem stopnia doktora**

Pracę magisterską pt: „Wpływ prolaktyny na replikację *Toxoplasma gondii* in vitro.”, wykonałem pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Henryki Długońskiej, w Zakładzie Immunoparazytologii, przy Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej, na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. W ramach pracy magisterskiej zajmowałem się badaniem wpływu ludzkich hormonów steroidowych i niesteroidowych na tempo i dynamikę namnażania się parazyta *Toxoplasma gondii* w warunkach hodowli in vitro. Wykazałem udział hormonów płciowych człowieka w modulacji odpowiedzi immunologicznej człowieka na zarażenia *T. gondii* [Płociński et al. 2007; Dzitko et al. 2010]. Podczas studiów, we własnym zakresie zorganizowałem praktyki w Instytucie Roberta Kocha w Niemczech, w ramach stypendium IAESTE, gdzie byłem zaangażowany w badania epidemiologiczne patogenów jelitowych człowieka. Badania prowadzone w

ramach pracy magisterskiej zaowocowały powstaniem jednej publikacji naukowej oraz jednej pracy przeglądowej.

#### Manuskrypty:

1. **Płociński P**, Dzitko K, Długońska H. Prolaktyna jako modulator odporności przeciw pasożytniczej. [Prolactin as a modulator of antiparasitic immunity]. Wiadomości Parazytologiczne. 2007; 53(4):263-70. Artykuł przeglądowy w języku polskim.
2. Dzitko K, Gatkowska J, **Płociński P**, Dziadek B, Długońska H. The effect of prolactin (PRL) on the growth of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. Parasitol Res. 2010 Jun;107(1):199-204. doi: 10.1007/s00436-010-1849-3. Epub 2010 Apr 16.

#### Doniesienia zjazdowe:

1. Dzitko K., **Płociński P.\***, Długońska H. Wpływ prolaktyny na wewnątrzkomórkową replikację *Toxoplasma gondii*. Łódź 2007, 46. Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej, wystąpienie ustne. \*- osoba prezentująca wyniki badań

Podczas pracy doktorskiej zmieniłem model badawczy na prątki gruźlicy. Pozwoliło mi to jednak wykorzystać w dużej części wiedzę dotyczącą *Toxoplasma gondii*, jako, podobnie jak *M. tuberculosis*, wewnątrzkomórkowego patogenu zakażającego olbrzymią część populacji ludzi na świecie. Oba patogeny, mimo oczywistych różnic wynikających z ich przynależności do różnych domen świata ożywionego, wzbudzają na przykład podobny rodzaj odpowiedzi odpornościowej u człowieka. Pracę z prątkami gruźlicy rozpocząłem w 2007 roku, od realizacji pracy doktorskiej w Centrum Nauk o Zdrowiu, przy szpitalu uniwersyteckim na Uniwersytecie Tekszańskim w Tyler, w USA. Rozprawa zatytułowana „Charakterystyka białka CrgA zaangażowanego w syntezę ściany komórkowej w procesie podziału komórki *Mycobacterium tuberculosis*” dotyczyła analizy udziału białka CrgA w proces podziałów komórkowych i cykl komórkowy mykobakterii. W ramach badań do rozprawy doktorskiej przygotowałem szczep mutant *M. tuberculosis* pozbawiony badanego genu, który został poddany analizom fenotypowym z określeniem jego przeżywalności w podłożach mikrobiologicznych, wrażliwości na antybiotyki i zdolności do infekcji linii komórkowej THP1 człowieka – pochodzenia monocytarno-makrofagowego. Z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej uwidoczniliem lokalizację białka CrgA w fuzji z eGFP, w komórkach

prątków, które umiejscawiało się w centralnej części komórki, w okolicy pierścienia podziałowego. Wykazałem także bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy białkiem pierścienia podziałowego FtsZ a CrgA. Praca badawcza zakończyła się opublikowaniem wyników doktoratu na łamach Journal of Bacteriology [Plocinski et al. 2011]. Równoległe do prac nad funkcją CrgA w komórkach prątków uczestniczyłem nad badaniami nad rolą proteazy ClpX w regulacji procesu podziału komórkowego i jego oddziaływań z białkiem FtsZ [Dziedzic et al. 2010]. Uczestniczyłem także w badaniach nad dwuskładnikowymi systemami przekazywania sygnału u prątków, związanymi z mechanizmami lekooporności naturalnej a prace te były kontynuowane po zakończeniu badań do pracy doktorskiej. Pracę doktorską obroniłem w październiku 2011 roku, w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi, z wyróżnieniem i nagrodą Rady Naukowej Instytutu.

### Manuskrypty:

1. Dziedzic R, Kiran M, **Plocinski P**, Ziolkiewicz M, Brzostek A, Moomey M, Vadrevu IS, Dziadek J, Madiraju M, Rajagopalan M. *Mycobacterium tuberculosis* ClpX interacts with FtsZ and interferes with FtsZ assembly. PLoS One. 2010 Jul 6;5(7):e11058. doi: 10.1371/journal.pone.0011058.

2. **Plocinski P**, Ziolkiewicz M, Kiran M, Vadrevu SI, Nguyen HB, Hugonnet J, Veckerle C, Arthur M, Dziadek J, Cross TA, Madiraju M, Rajagopalan M. Characterization of CrgA, a new partner of the *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycan polymerization complexes. J Bacteriol. 2011 Jul;193(13):3246-56. doi: 10.1128/JB.00188-11. Epub 2011 Apr 29.

### Doniesienia zjazdowe:

1. Dziedzic R., Kiran M., **Płociński P.**, Madiraju M.V.M., Rajagopalan M. „Regulation of cell division in *Mycobacterium tuberculosis*”. MICROBIOT 2008 The 1st Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection, wrzesień 2008, Łódź, plakat.

2. Dziedzic R., Kiran M., **Plocinski P.**, Brzostek A., Guzek M., Dziadek J., Madiraju M.V.M., Rajagopalan M. „FtsZ – ClpX interaction and its role in the cell division process in *Mycobacterium tuberculosis*”. Texas Tuberculosis Researcher Symposium, luty 2009, Houston, USA, plakat,

3. Dziejic R., Kiran M., **Plocinski P.**, Ziółkiewicz M., Brzostek A., Moomey M., Vadrevu I., Dziadek J., Madiraju M.V.M., Rajagopalan M. „*Mycobacterium tuberculosis* ClpX interacts with FtsZ and interferes with FtsZ assembly” 110th General meeting of American Society for Microbiology, maj 2010, San Diego, USA, plakat,

4. **Plocinski P.**, Kiran M., Nguyen H., Dziejic R., Cross T., Ziółkiewicz M., Brzostek A., Dziadek J., Madiraju M.V.M., Rajagopalan M. „*Mycobacterium tuberculosis* protein Rv0011c: Interaction with FtsZ and role in cell division” 110th General meeting of American Society for Microbiology, maj 2010, San Diego, USA, plakat,

#### Wsparcie finansowe:

1. ZPORR, Działanie 2.6: Stypendia wspierające innowacyjne badania naukowe doktorantów „Badania nad regulacją podziału komórkowego u *Mycobacterium tuberculosis*” Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki, 2009, **kierownik projektu**, projekt zakończony w 2009.

2. Projekty finansowane przez amerykańskie Ministerstwo Zdrowia i Pomocy Humanitarnej w ramach NIH (National Institutes of Health): „*Mycobacterium tuberculosis* cell division and proliferation”, grant nr: R01-AI48417; oraz „*Mycobacterium tuberculosis* replication and proliferation”, grant nr: R01-AI084734, University of Texas, Health Science Center w Tyler, USA, lata 2007-2010, **jako wykonawca**, projekt zakończony.

#### Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po powrocie ze Stanów Zjednoczonych dołączyłem do grupy prof. dr hab. Andrzeja Dziembowskiego w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. W ramach międzynarodowego przedsięwzięcia - SystemTB, gdzie analizowałem kompleksy białkowe uczestniczące w kluczowych procesach życiowych prątków gruźlicy, w celu wyznaczenia nowych, molekularnych tarcz terapeutycznych do walki z tą chorobą [Plocinski et al. 2014; Machova et al. 2014]. Pracę nad charakterystyką kompleksów białkowych prątków kontynuowałem podczas staży podoktorskich w Instytucie Francisca Cricka, w Londynie (na zaproszenie Prof. Douglasa Younga) oraz Centrum Badania Stabilności i Uszkodzeń Genomu Uniwersytetu w Sussex, w Brighton

(w ramach projektu Mobilność Plus, finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego), w Wielkiej Brytanii. Projekty realizowane przeze mnie dotyczyły głównie mechanizmów degradacji RNA oraz napraw DNA u bakterii i organizmów wyższych, wliczając człowieka. Byłem odpowiedzialny między innymi za ustalenie partnerów oddziaływań karboksykinazy fosfoenolpirogonianowej w komórkach prątków gruźlicy i analizę danych proteomicznych przy badaniu oddziaływań ludzkiej interleukiny 8 z białkami powierzchniowymi prątków. Udział w projektach międzynarodowych zaowocował powstaniem publikacji naukowych w renomowanych czasopismach o zasięgu ogóln światowym [Machova et al. 2014, Bartlett et al. 2016, Dziadek et al. 2016], włączając pracę w prestiżowym czasopiśmie Nature Communications dotyczącą odkrycia mykobakteryjnego systemu napraw źle sparowanych nukleotydów DNA przy udziale białka NucS. Praca ta opisywała po raz pierwszy u bakterii z rodzaju *Actinobacteriaceae* istnienie systemu naprawy DNA, który do tej pory był uznawany za całkowicie nieobecny w tej grupie bakterii [Castaneda-Garcia et al. 2017].

#### Manuskrypty:

1. Machová I, Snašel J, Zimmermann M, Laubitz D, **Plocinski P**, Oehlmann W, Singh M, Dostál J, Sauer U, Pichová I. *Mycobacterium tuberculosis* phosphoenolpyruvate carboxykinase is regulated by redox mechanisms and interaction with thioredoxin. J Biol Chem. 2014 May 9;289(19):13066-78. doi: 10.1074/jbc.M113.536748. Epub 2014 Mar 21.
2. Bartlett EJ, Brissett NC, **Plocinski P**, Carlberg T, Doherty AJ. Molecular basis for DNA strand displacement by NHEJ repair polymerases. Nucleic Acids Res. 2016 Mar 18;44(5):2173-86. doi: 10.1093/nar/gkv965. Epub 2015 Sep 23.
3. Dziadek B, Brzostek A, Grzybowski M, Fol M, Krupa A, Kryczka J, **Plocinski P**, Kurdowska A, Dziadek J. *Mycobacterium tuberculosis* AtsG (Rv0296c), GlmU (Rv1018c) and SahH (Rv3248c) Proteins Function as the Human IL-8-Binding Effectors and Contribute to Pathogen Entry into Human Neutrophils. PLoS One. 2016 Feb 1;11(2):e0148030. doi: 10.1371/journal.pone.0148030. eCollection 2016.

4. Castañeda-García A, Prieto AI, Rodríguez-Beltrán J, Alonso N, Cantillon D, Costas C, Pérez-Lago L, Zegeye ED, Herranz M, Płociński P, Tonjum T, García de Viedma D, Paget M, Waddell SJ, Rojas AM, Doherty AJ, Blázquez J. A non-canonical mismatch repair pathway in prokaryotes. *Nat Commun.* 2017 Jan 27;8:14246. doi: 10.1038/ncomms14246.

### **Doniesienia zjazdowe:**

1. **Płociński P.** Laubitz D., Cichocki B., Cysewski D., Malinowska A., Dziembowski A. „High-throughput Analysis of Mycobacterial Interactome”. EMBO conference TUBERCULOSIS 2012, wrzesień 2012, Paryż, Francja, plakat,
2. **Płociński P.** Macios M, Niemiec E, Houghton J, Young D, Dziembowski A. „Degradosome as one of the major RNA processing complexes in Mycobacteria”, lipiec 2014 - wykład na zaproszenie podczas 60-tej rocznicy utworzenia towarzystwa naukowego Acid Fast Club, Instytut Roberta Kocha, w Berlinie, w Niemczech,
3. **Płociński P.** „Degradosome as one of the major RNA processing complexes in Mycobacteria”, 2015 - wykład na zaproszenie podczas serii wykładów “Work in Progress”, School of Life Sciences, Uniwersytet w Sussex, Brighton, Wielka Brytania,
4. **Płociński P.** Brissett N, Korycka-Machała M, Brzostek A, Dziembowski A, Dziadek J, Doherty A. „Prim2 and LigC are involved in stationary-phase base excision repair in mycobacteria”, 2015, Annual Life Sciences Retreat 2015, w Brighton, w Wielkiej Brytanii, plakat, wyróżniony nagrodą za najlepszy plakat wśród naukowców na stanowisku post-doc.
5. **Płociński P.** „DNA repair systems of tubercle bacilli – new perspective”. wrzesień 2016 - wykład na zaproszenie podczas V Kongresu Genetyki w Łodzi
6. **Płociński P.** „Degradosome as one of the major RNA processing complexes in Mycobacteria”, Konferencja Mikrobiot 2017, Łódź, wystąpienie ustne
7. **Brzostek A., Płociński P., Dziadek J.** „DNA repair in the pathogenicity of tubercle bacilli”. wrzesień 2017, 7th International Weigl Conference, Lwów, Ukraina, plakat

8. **Płociński P.** „An essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*”. Global Summit on Microbiology and Virology 2019, Praga, Republika Czeska, wystąpienie ustne  
osoba prezentująca wyniki badań

#### Wsparcie finansowe:

1. PPN/BIL/2018/1/00206/U/00004 „Badanie funkcjonalnych kompleksów białkowych u mykobakterii w celu odkrycia nowych leków przeciwgruźliczych”, **koordynator po stronie polskiej**, projekt wymiany bilateralnej POLONIUM, wraz z Instytutem Farmakologii i Biologii Strukturalnej w Tuluzie, we Francji,
2. 2015/19/D/NZ1/02842 „Udział białek rdzenia degradosomu RNA w regulacji metabolizmu prątków gruźlicy”, **kierownik**, SONATA 10, Narodowe Centrum Nauki,
3. 1073/MOB/2013/0 „Rola bakteryjnych prymaz typu AEP oraz ligaz DNA w naprawie DNA u prątków z rodzaju *Mycobacterium*”, **kierownik**, Mobilność Plus III, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego,
4. FP7-HEALTH 241587 SystemTB (Systems biology of *Mycobacterium tuberculosis*), **wykonawca**, FP7 European Commission,

W obrębie moich zainteresowań znajdują się również dwukomponentowe ścieżki transdukcji sygnału u prątków gruźlicy. Dzięki zaangażowaniu swoich umiejętności w obrębie bioinformatycznej analizy danych wysokoprzepustowych w zakresie proteomiki i transkryptomiki wniosłem istotny wkład w określenie roli kilku białek transdukcji sygnału w metabolizmie prątków. [Plocinska et al. 2012, Dadura et al. 2017, Antczak et al. 2018, Plocinska et al. 2022]

#### Manuskrypty:

1. Plocinska R, Purushotham G, Sarva K, Vadrevu IS, Pandeeti EV, Arora N, Plocinski P, Madiraju MV, Rajagopalan M. Septal localization of the *Mycobacterium tuberculosis* MtrB sensor kinase promotes MtrA regulon expression. J Biol Chem. 2012 Jul 6;287(28):23887-99. doi: 10.1074/jbc.M112.346544. Epub 2012 May 20.

2. Antczak M, Płocińska R, Płociński P, Rumijowska-Galewicz A, Żaczek A, Strapagiel D, Dziadek J. The NnaR orphan response regulator is essential for the utilization of nitrate and nitrite as sole nitrogen sources in mycobacteria. *Sci Rep.* 2018 Dec 3;8(1):17552. doi: 10.1038/s41598-018-35844-z.
3. Dadura K, Płocińska R, Rumijowska-Galewicz A, Płociński P, Żaczek A, Dziadek B, Zaborowski A, Dziadek J. PdtA Deficiency Affects Resistance of Mycobacteria to Ribosome Targeting Antibiotics. *Front Microbiol.* 2017 Nov 3;8:2145. doi: 10.3389/fmicb.2017.02145. eCollection 2017.
4. Płocińska R, Wasik K, Płociński P, Lechowicz E, Antczak M, Błaszczuk E, Dziadek B, Słomka M, Rumijowska-Galewicz A, Dziadek J. The Orphan Response Regulator Rv3143 Modulates the Activity of the NADH Dehydrogenase Complex (Nuo) in *Mycobacterium tuberculosis* via Protein-Protein Interactions. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jun 28;12:909507. doi: 10.3389/fcimb.2022.909507.

#### Doniesienia zjazdowe:

1. Rajagopalan M., Plocinska R., Gorla P., Sarva K., Vadrevu I., Pandeeti E., Arora N., Plocinski P., Madiraju M. „*Mycobacterium tuberculosis* MtrB sensor kinase septal localization and the expression of MtrA response regulator targets”. EMBO conference TUBERCULOSIS 2012, wrzesień 2012, Paryż, Francja; - prezentacja plakatowa,
2. Antczak M., Płocińska R., Płociński P., Rumijowska-Galewicz A., Dziadek J. Rola białek regulatorowych MSMEG\_5784 oraz MSMEG\_0432 w metabolizmie związków azotowych u *Mycobacterium smegmatis*. III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen. 11-12.05.2017, Łódź; - prezentacja plakatowa,
3. Antczak M., Płocińska R., Płociński P., Dadura K., Dziadek J. The role of MSMEG\_0432 regulatory protein of *Mycobacterium smegmatis* in nitrogen metabolism. 4th Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection MIKROBIOT 2017. 19-21.09.2017, Łódź – prezentacja plakatowa;

4. Dadura K., Rumijowska-Galewicz A., Lewandowska K., Żaczek A., Płocińska R., Płociński P., Antczak M., Dziadek J. PdaS deficiency affects resistance of mycobacteria to ribosome targeting antibiotics. 4th Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection MIKROBIOT 2017, 19-21.09.2017, Łódź – prezentacja plakatu.

Obecnie kontynuuję badania nad naprawami DNA i degradacją RNA, w ramach projektów SONATA (projekt zakończony), Opus (2020-2024) oraz SONATA BIS (2020-2025), których jestem kierownikiem. Procesy metabolizmu kwasów nukleinowych są niezwykle ważne dla przeżywania każdej żyjącej komórki [Płocińska et al. 2017]. W roku 2020 nawiązałem współpracę z Prof. Nicolai van Oers z University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, z którym wspólnie podsumowaliśmy dostępne w literaturze naukowej informacje na temat regulacji transkrypcji u mykobakterii przy udziale małych niekodujących RNA [Coskun et al. 2021]. W tym samym roku podjąłem współpracę z grupą Prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej nad zbadaniem wpływu histonopodobnych białek bakteryjnych wiążących DNA u prątków, w której to pracy przeprowadziłem analizy transkryptomiczne szczepów pozbawionych badanych białek w warunkach normoksji i hipoksji [Kołodziej et al. 2021]. Obecnie, podtrzymując współpracę z grupą prof. Doherty, u którego odbywałem długoterminowy staż doktorski, kontynuuję pracę nad mechanizmami naprawy uszkodzeń DNA u prątków. Dalsze badania nad enzymem Prim-PolC zaowocowały powstaniem publikacji [Brissett et al. 2020], do której przygotowywałem część konstruktyw genetycznych i testowałem aktywność zmutowanych wariantów białka PrimPolC. Wraz z dr hab. Anną Brzostek pełniłem funkcję wiodącą w badaniach nad opisaniem RecA-zależnej i RecA-niezależnej odpowiedzi na indukowanie uszkodzeń DNA u prątków opisanej w pracy z 2021 roku [Brzostek, Plocinski et al. 2021]. Badania podstawowe nad procesami napraw DNA dostarczają informacji o mechanizmach konserwowanych ewolucyjnie, wspólnych dla komórek bakterii i organizmów wyższych. Procesy te są związane np. z mechanizmami nowotworzenia i starzenia się, ważnymi problemami biologii i medycyny w skali kraju i świata.

#### Manuskrypty:

1. Płocińska R, Korycka-Machała M, **Płociński P**, Dziadek J. Mycobacterial DNA Replication as a Target for Antituberculosis Drug Discovery. Curr Top Med Chem. 2017

Jun 16;17(19):2129-2142. doi: 10.2174/1568026617666170130114342. Praca przeglądowa w języku angielskim.

2. Coskun FS, **Płociński P**, van Oers NSC. Small RNAs Asserting Big Roles in Mycobacteria. Noncoding RNA. 2021 Oct 29;7(4):69. doi: 10.3390/ncrna7040069. Praca przeglądowa w języku angielskim.

3. Kołodziej M, Łebkowski T\$, **Płociński P**\$, Hołowka J, Paściak M, Wojtaś B, Bury K, Konieczny I, Dziadek J, Zakrzewska-Czerwińska J. Lsr2 and Its Novel Paralogue Mediate the Adjustment of *Mycobacterium smegmatis* to Unfavorable Environmental Conditions. mSphere. 2021 May 12;6(3):e00290-21. doi: 10.1128/mSphere.00290-21. [\$ - równy wkład autorów]

4. Brissett NC, Zabraday K, **Płociński P**, Bianchi J, Korycka-Machała M, Brzostek A, Dziadek J, Doherty AJ. Molecular basis for DNA repair synthesis on short gaps by mycobacterial Primase-Polymerase C. Nat Commun. 2020 Aug 21;11(1):4196. doi: 10.1038/s41467-020-18012-8.

5. Brzostek A\*, **Płociński P**\*, Minias A, Ciszewska A, Gąsior F, Pawełczyk J, Dziadek B, Słomka M, Dziadek J. Dissecting the RecA-(In)dependent Response to Mitomycin C in *Mycobacterium tuberculosis* Using Transcriptional Profiling and Proteomics Analyses. Cells. 2021 May 11;10(5):1168. doi: 10.3390/cells10051168. [\* - równy wkład autorów]

6. **Płociński P**, Dziadek J. New players of DNA excision repair in mycobacteria. Annual Report of the Polish Academy of Sciences. 2018: 62-64. ISSN 1640-3754. Artykuł popularno-naukowy.

#### Doniesienia konferencyjne:

1. 22-23 lipca 2023 r. konferencja naukowa Gordon Research Seminars Tuberculosis Drug Discovery and Development, Barcelona, Hiszpania, „Towards deciphering the role of SRAP Proteins Associated with DNA Damage Repair in *Mycobacterium*”. Gąsior F., **Płociński P**., Dziadek J., Brzostek A. - prezentacja plakatowa.

2. 22-23 lipca 2023 r. konferencja naukowa Gordon Research Seminars Tuberculosis Drug Discovery and Development, Barcelona, Hiszpania, „Mycobacterial RNA decay machinery as a target for the development of future antimicrobials”. Lavrynychuk Y., Skibiński J, Włodarczyk M., Dziadek J., Chmiela M., **Płociński P.** – prezentacja plakatowa.
3. 15 – 17 września 2022 r. XXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Warszawa, Polska, „Ocena wydajności procesu trans-translacji u prątków gruźlicy w świetle aktywności przeciwprątkowej pirazynamidu”. Lavrynychuk Y, **Płociński P**, Chmiela M. – prezentacja plakatowa.
4. 15 – 17 września 2022 r. XXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Warszawa, Polska, „Badanie aktywności helikazy bakteryjnej z rodziny DEAD, w kontekście poszukiwania nowych leków przeciwdrobnoustrojowych w celu zwalczania zakażeń lekoopornymi pałeczkami *Helicobacter pylori*”. Skibiński J, **Płociński P**, Rudnicka K, Zarzecka U, Chmiela M. – prezentacja ustna.
5. 27 – 30 czerwca 2022 r. VI Polski Kongres Genetyki, Kraków, Polska, „Functional analysis of a potential DNA repair protein Msmeg\_1891 in *Mycobacterium smegmatis*”. Gąsior F., **Płociński P.**, Dziadek J., Brzostek A. – prezentacja ustna.
6. 28-29 czerwca 2021, ESM 41st Annual Congress (Virtual), „Determination of the Msmeg\_1891 role in response to DNA damage in *M. smegmatis*”. Gąsior F., **Płociński P.**, Dziadek J., Brzostek A. – prezentacja plakatowa.
7. 2 Grudnia 2019 r., Makro- kierunki w mikro-biologii, Warszawa. „Udział białka Msmeg\_1891 w odpowiedzi na uszkodzenia DNA u prątków *M. smegmatis*”. Gąsior F., **Płociński P.**, Dziadek J., Brzostek A. – prezentacja plakatowa.

#### Wsparcie finansowe:

1. OPUS 17, „Weryfikacja roli białek - przewidywanych czynników naprawczych, biorących udział w naprawach pęknięć DNA u mykobakterii”, na kwotę 1 374 500 zł, finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki, realizowany w Instytucie Biologii Medycznej PAN 30 września 2024 r. **jako kierownik projektu.**

2. SONATA BIS 9, „Badania strukturalne udziału degradosomu RNA w trans-translacji w świetle przeciwbakteryjnej aktywności pirazynamidu - perspektywy wynalezienia leków przeciw(myko)bakteryjnych.”, na kwotę 2 999 000 zł, sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki, realizowany na Uniwersytecie Łódzkim do 30 września 2025 r., **jako kierownik projektu.**

3. SONATA 10, „Udział białek rdzenia degradosomu RNA w regulacji metabolizmu prątków gruźlicy” na kwotę 672 300 zł, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, realizowany w Instytucie Biologii Medycznej PAN w latach 2016 a 2019, **jako kierownik projektu**, projekt zakończony.

Dzięki zdobytym przeze mnie umiejętnościom w obszarze bioinformatycznej analizy danych transkryptomicznych i proteomicznych często angażuję się we współpracy naukowej w badania wykraczające poza moje główne zainteresowania naukowe, którymi pozostaje metabolizm kwasów nukleinowych prątków gruźlicy. W ramach współpracy wewnętrznej w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi przeprowadziłem m.in. analizę danych transkryptomicznych z prątków gruźlicy hodowanych w obecności cholesterolu [Pawełczyk et al. 2021], zasiedlających ludzkie makrofagi [Kawka et al. 2021], czy prątków potraktowanych innowacyjnymi inhibitorami wzrostu [Korycka-Machała et al. 2022]. Dla grupy Prof. dr hab. Jerzego Długońskiego z Uniwersytetu Łódzkiego przeprowadzałem analizy proteomiczne dla identyfikacji gatunkowej grzybów produkujących enzym o potencjalnie dużym znaczeniu dla przemysłu [Góralczyk et al. 2020], a w pracy z grupą dr hab. Joanny Bonceli, prof. IBM PAN identyfikowałem w widmach masowych wariant peptydu ludzkiej Neuromedyny U odpowiadający za ciekawy efekt fenotypowy w kontekście zjawisk nowotworzenia i przerzutowania nowotworów [Przygodzka et al. 2021].

#### **Manuskrypty:**

1. Pawełczyk J, Brzostek A, Minias A, **Płociński P**, Rumijowska-Galewicz A, Strapagiel D, Zakrzewska-Czerwińska J, Dziadek J. Cholesterol-dependent transcriptome remodeling reveals new insight into the contribution of cholesterol to *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. Sci Rep. 2021 Jun 11;11(1):12396. doi: 10.1038/s41598-021-91812-0.

2. Kawka M, Brzostek A, Dzitko K, Kryczka J, Bednarek R, Płocińska R, **Płociński P**, Strapagiel D, Gatkowska J, Dziadek J, Dziadek B. *Mycobacterium tuberculosis* Binds Human Serum Amyloid A, and the Interaction Modulates the Colonization of Human Macrophages and the Transcriptional Response of the Pathogen. *Cells*. 2021 May 20;10(5):1264. doi: 10.3390/cells10051264.
3. Korycka-Machała M, Kawka M, Lach J, Płocińska R, Bekier A, Dziadek B, Brzostek A, **Płociński P**, Strapagiel D, Szczesio M, Gobis K, Dziadek J. 2,4-Disubstituted pyridine derivatives are effective against intracellular and biofilm-forming tubercle bacilli. *Front Pharmacol*. 2022 Nov 10;13:1004632. doi: 10.3389/fphar.2022.1004632.
4. Góralczyk-Bińkowska A, Jasińska A, Długoński A, **Płociński P**, Długoński J. Correction: Laccase activity of the ascomycete fungus *Nectriella pironii* and innovative strategies for its production on leaf litter of an urban park. *PLoS One*. 2020 May 14;15(5):e0233553. doi: 10.1371/journal.pone.0233553.
5. Przygodzka P, Sochacka E, Soboska K, Pacholczyk M, Papiewska-Pajak I, Przygodzki T, **Płociński P**, Ballet S, De Prins A, Boncela J. Neuromedin U induces an invasive phenotype in CRC cells expressing the NMUR2 receptor. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021 Sep 7;40(1):283. doi: 10.1186/s13046-021-02073-8.

Od stycznia 2020 roku zaangażowałem się w projekt realizowany w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, w grupie badawczej Pani Prof. dr hab. Magdaleny Mikołajczyk-Chmieli. Projekt zatytułowany „Wielofunkcyjne kompozyty aktywne biologicznie do zastosowań w medycynie regeneracyjnej układu kostnego”, został przyznany w ramach konkursu TEAM-NET Fundacji Rzecz Nauki Polskiej finansowanego z środków Unii Europejskiej. W drodze konkursowej objąłem w tym projekcie rolę Młodego Lidera Zespołu Badawczego i podjąłem wyzwanie koordynowania prac zespołu projektowego Uniwersytetu Łódzkiego w aspektach merytorycznych, przy wsparciu członka komitetu sterującego projektem – dr Karoliny Rudnickiej. Projekt jest realizowany na zasadzie współpracy wielośrodkowej, w konsorcjum naukowym kierowanym przez zespół Prof. dr hab. inż. Andrzeja Trochimczuka z Politechniki Wrocławskiej, wraz z grupą Prof. dr hab. inż.

Agnieszki Sobczak-Kupiec z Politechniki Krakowskiej i grupą Dr inż. Moniki Biernat z Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych Sieci Badawczej Łukasiewicz z siedzibą w Warszawie. Dzięki uzyskaniu przez naszą grupę badawczą dofinansowania na dodatkowe zadanie badawcze w projekcie, badania są kontynuowane do końca września tego roku. Jak dotąd współpraca całego konsorcjum zaowocowała powstaniem co najmniej 28 publikacji naukowych oraz 11 zgłoszeń patentowych, a w przeważającej większości były to prace realizowane we współpracy co najmniej 2 spośród 4 partnerów konsorcjum. Badania dotyczyły opracowania innowacyjnych biomateriałów polimerowo-ceramicznych do zastosowań w medycynie regeneracyjnej do leczenia ubytków tkanki kostnej. Moje zaangażowanie się w badania nad biomateriałami było rozwijane poprzez współprace naukowe naszego zespołu z grupą Prof. dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło z Uniwersytetu Gdańskiego oraz z grupą dr hab. inż. Katarzyny Nawrotek z Politechniki Łódzkiej. Badania dotyczyły głównie analiz cytozgodności, biogodności i bioefektywności, jako badania normatywne, w oparciu o system norm ISO 19993 i obejmowały badania *in vitro* i *in vivo* na modelach myszy domowej i szczura wędrownego. Zaangażowanie w projekt TEAM-NET zmotywowało mnie do zdobywania dodatkowych kwalifikacji jak chociażby uprawnień do prowadzenia eksperymentów na zwierzętach czy do odbycia szkolenia z prowadzenia badań klinicznych, co jest niezbędne do przyszłej komercjalizacji opracowywanych obecnie w naszych badaniach rozwiązań.

### Manuskrypty:

1. Urbaniak MM, Gazińska M, Rudnicka K, **Płociński P**, Nowak M, Chmiela M. In Vitro and In Vivo Biocompatibility of Natural and Synthetic *Pseudomonas aeruginosa* Pyomelanin for Potential Biomedical Applications. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 25;24(9):7846. doi: 10.3390/ijms24097846.
2. Biernat M, Szwed-Georgiou A, Rudnicka K, **Płociński P**, Pagacz J, Tymowicz- Grzyb P, Woźniak A, Włodarczyk M, Urbaniak MM, Krupa A, Rusek-Wala P, Karska N, Rodziewicz-Motowidło S. Dual Modification of Porous Ca-P/PLA Composites with APTES and Alendronate Improves Their Mechanical Strength and Cytobiocompatibility towards Human Osteoblasts. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 18;23(22):14315. doi: 10.3390/ijms232214315.

3. Kasprzak M, Szabłowska A, Kurzyk A, Tymowicz-Grzyb P, Najmrodzki A, Woźniak A, Antosik A, Pagacz J, Szterner P, Plichta A, Wieciński P, Rusek-Wala P, Krupa A, **Płociński P**, Rudnicka K, Biernat M. Effects of Sterilization and Hydrolytic Degradation on the Structure, Morphology and Compressive Strength of Polylactide-Hydroxyapatite Composites. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 9;23(18):10454. doi: 10.3390/ijms231810454.
4. Korbut A, Włodarczyk M, Rudnicka K, Szwed A, **Płociński P**, Biernat M, Tymowicz-Grzyb P, Michalska M, Karska N, Rodziewicz-Motowidło S, Szustakiewicz K. Three Component Composite Scaffolds Based on PCL, Hydroxyapatite, and L-Lysine Obtained in TIPS-SL: Bioactive Material for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 18;22(24):13589. doi: 10.3390/ijms222413589.
5. Piszko P, Włodarczyk M, Zielińska S, Gazińska M, **Płociński P**, Rudnicka K, Szwed A, Krupa A, Grzymajło M, Sobczak-Kupiec A, Słota D, Kobielarz M, Wojtków M, Szustakiewicz K. PGS/HAp Microporous Composite Scaffold Obtained in the TIPS- TCL-SL Method: An Innovation for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 10;22(16):8587. doi: 10.3390/ijms22168587.
6. Szustakiewicz K, Włodarczyk M, Gazińska M, Rudnicka K, **Płociński P**, Szymczyk-Ziółkowska P, Ziółkowski G, Biernat M, Sieja K, Grzymajło M, Józwiak P, Michlewska S, Trochimczuk AW. The Effect of Pore Size Distribution and l-Lysine Modified Apatite Whiskers (HAP) on Osteoblasts Response in PLLA/HAP Foam Scaffolds Obtained in the Thermally Induced Phase Separation Process. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 30;22(7):3607. doi: 10.3390/ijms22073607.
7. Nawrotek K, Rudnicka K, Gatkowska J, Michlewska S, Pearson BL, **Płociński P**, Wieczorek M. Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 3-loaded microspheres penetrate neurons in vitro causing active demethylation and neurite outgrowth. *J Tissue Eng Regen Med.* 2021 May;15(5):463-474. doi: 10.1002/term.3185.
8. Gazińska M, Krokos A, Kobielarz M, Włodarczyk M, Skibińska P, Stępak B, Antończak A, Morawiak M, **Płociński P**, Rudnicka K. Influence of Hydroxyapatite Surface Functionalization on Thermal and Biological Properties of Poly(l-Lactide)- and Poly(l-

Lactide-co-Glycolide)-Based Composites. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 13;21(18):6711. doi: 10.3390/ijms21186711.

### **Doniesienia konferencyjne:**

1. 19-24 marca 2023 r. konferencja naukowa Gordon Research Conferences Cartilage Biology and Pathology, Lucca, Włochy, „Comprehensive assessment of biocompatibility and bioactivity of piomelanin-based composites supporting bone regeneration”. Urbaniak M. M., Szwed-Georgiou A., Krupa A., Włodarczyk M., Nowak M., Gazińska M., Biernat M., Szustakiewicz K., Płociński P., Rudnicka K. – prezentacja plakatowa.

2. 27 -28 maj 2022 r. Ogólnopolska konferencja IMPLANTY 2022 - Inżynieria, Medycyna i Nauka w pogoni za implantem doskonałym Gdańsk, Polska, Politechnika Gdańska, „Biokompatybilność piomelanin *Pseudomonas aeruginosa* - naturalnych polimerów o potencjale regeneracyjnym”. Urbaniak M. M., Rudnicka K., Płociński P., Nowak M., Gazińska M., Cybulski M., Mikołajczyk-Chmiela M. – prezentacja plakatowa.

3. 27 -28 maj 2022 r. Ogólnopolska konferencja IMPLANTY 2022 - Inżynieria, Medycyna i Nauka w pogoni za implantem doskonałym Gdańsk, Polska, Politechnika Gdańska, „Biologiczny efekt modyfikacji cholesterolem kompozytów PLA-HAp na wzrost ludzkich osteoblastów”. Rusek-Wala P, Biernat M, Woźniak M, Włodarczyk M, Płociński P, Krupa A. – prezentacja plakatowa.

4. 14-17 października 2021, 30th Anniversary Conference of the Polish Society for Biomaterials “Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine”, Rytro, Polska „Physicochemical and in vitro biological properties of porous PLLA/HAp-Zn composites modified with sodium alendronate” Biernat M., Kasprzak M., Szabłowska A., Woźniak A., Najmrodzki A., Tymowicz-Grzyb P., Antosik A., Rusek-Wala P., Krupa A., Płociński P. – prezentacja plakatowa.

5. 12-15 luty 2020 r, 1st Open Meeting of the EuroMicroPH, CA18113 – Understanding and exploiting the impacts of low pH on microorganisms, COST European Cooperation in Science & Technology, Instituto Superior Técnico, Lizbona, Portugalia, “Physicochemical and biological characterization of pyomelanin isolated from *P. aeruginosa* in regard of

antimicrobial and proregenerative activity”, Urbaniak M., Gonciarz W., Rudnicka K., Płociński P., Chmiela M. – prezentacja plakatowa.

### Wsparcie finansowe:

1. Dodatkowe zadanie badawcze w ramach rozszerzenia projektu TEAM-NET „Kompleksowa ocena biogodności i bioaktywności piomelaniny wspierającej procesy regeneracji i unaczyniania kośćca”, na kwotę 874 831 zł, finansowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, realizowane na Uniwersytecie Łódzkim do 30 września 2023 r. jako wnioskodawca o dofinansowanie i Lider Młodego Zespołu Badawczego.

### Plany naukowe

Prowadzone przeze mnie aktualnie badania naukowe skupiają się głównie na analizie funkcji komórkowych elementów degradosomu RNA prątków chorobotwórczych *Mycobacterium tuberculosis* oraz saprofitycznych *Mycolicibacterium smegmatis*. Analiza podobieństw i różnic w zakresie roli poszczególnych białek kompleksu degradosomu RNA u tych bakterii dostarczy wiedzy podstawowej dla zrozumienia mechanizmów posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów u bakterii. Obecnie, wraz z doktorantami, podejmuję próby krystalizacji składnika degradosomu prątków białka PNP, w celu rozwiązania jego struktury, dla pełniejszego zrozumienia mechanizmu działania kwasu pirazynowego (aktywnego metabolitu pirazynamidu) na prątki gruźlicy. W niedalekiej przyszłości zamierzam także zoptymalizować kolorymetryczny test na aktywność białka PNP, wykorzystujący jego zdolność do hydrolizy alarmonu (p)ppGpp w warunkach *in vitro* lub zaprojektować alternatywny test umożliwiający śledzenie aktywności PNP.

Test kolorymetryczny umożliwi przeprowadzanie wysokoprzepustowych analiz przesiewowych, w poszukiwaniu inhibitorów tego niezbędnego składnika degradosomu RNA prątków. Dodatkowe eksperymenty przy użyciu już przygotowanych szczepów mutantów *M. tuberculosis* z regulowaną produkcją składników degradosomu RNA pozwolą ustalić rolę tych enzymów dla prawidłowej adaptacji bakterii do warunków stresu tlenowego. Jednocześnie planuję kontynuację prac związanych z badaniami dotyczącymi mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA u prątków w kontekście analizy kompleksów białkowych zaangażowanych w te procesy.

## 5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Moje badania mają charakter uniwersalny i interdyscyplinarny. Odbyłem liczne, długookresowe pobyty w zagranicznych instytucjach naukowych oraz uczestniczyłem w licznych międzynarodowych konferencjach naukowych, gdzie czynnie promuję polską naukę. Jednocześnie aktywnie angażuję się w projekty realizowane we współpracy wielośrodkowej, wliczając projekty międzynarodowe podejmujące badania w obszarach mających wpływ na rozwiązywanie ogólnoswiatowych problemów zdrowia publicznego, w obszarze mikrobiologii i badań nad mechanizmami regeneracji tkanek.

Moje dotychczasowe zatrudnienie obejmowało umowy o pracę na Uniwersytecie Teksańskim w Tyler, USA (2007-2010), Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie (2011-2016), Narodowe Centrum Badań Medycznych w Londynie, w Wielkiej Brytanii (2014), Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi (2016- obecnie) oraz Uniwersytet Łódzki (2020-obecnie). W ramach każdej z umów o pracę prowadziłem badania naukowe, które w istotny sposób przyczyniły się do rozwoju wiedzy w obszarach prowadzonych badań o czym mogą świadczyć publikacje naukowe w renomowanych czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej, o znaczących współczynnikach wpływu Impact Factor. Nieustannie rozwijam współpracę naukowe nawiązane podczas staży zagranicznych, czy podczas zaangażowania w programy współpracy międzynarodowej w których uczestniczyłem.

### 5.1. Pobyty w zagranicznych jednostkach naukowych

#### ***Przed uzyskaniem stopnia doktora***

wrzesień 2007 - grudzień 2010 (40 miesięcy) – staż w Centrum Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Teksańskiego w Tyler, (*org. The University of Texas, Health Science Center at Tyler*), pod opieką promotorską prof. Malini Rajagopalan, Tyler, Teksas, USA.

lipiec i sierpień 2006 (2 miesiące) - praktyki w laboratorium naukowym w ramach programu wymiany IAESTE, Narodowe Centrum Referencyjne Badań nad Salmonella i

innymi Enterobakteriami, Instytut Roberta Kocha, w grupie kierowanej przez prof. Helmuta Tschaepe, Wernigerode, Niemcy

### **Po uzyskaniu stopnia doktora**

lipiec 2014 - czerwiec 2016 (24 miesiące) – staż podoktorski w Centrum Badań nad Uszkodzeniami i Stabilnością Genomu (*Medical Research Council Genome Damage and Stability Centre*), pod opieką prof. Aidana Doherty, Uniwersytet w Sussex, Brighton, Wielka Brytania, oddelegowany z Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w ramach urlopu bezpłatnego do realizacji projektu „Mobilność Plus III”

styczeń 2014 - czerwiec 2014 (6 miesięcy) – staż podoktorski w Narodowym Centrum Badań Medycznych (*Medical Research Council National Institute for Medical Research*, przekształcone w Instytut Francisa Cricka), w grupie prof. Douglasa Younga, Londyn, Wielka Brytania, do realizacji współpracy naukowej w ramach projektu SystemTB (*Biologia Systemowa Mycobacterium tuberculosis*)

## **5.2 Współpraca naukowa poparta wspólnymi publikacjami lub aplikacjami o finansowanie badań na szczeblu krajowym lub międzynarodowym**

1. Instytut Farmakologii i Biologii Strukturalnej, Uniwersytet w Tuluzie, Tuluza, Francja, dr hab. Hedia Marrakchi, wspólne zaangażowanie w realizację projektów SystemTB oraz POLONIUM.
2. Instytut Francisa Cricka, Londyn, Wielka Brytania, prof. Douglas Young\*, wspólne zaangażowanie w realizację projektu SystemTB.
3. Londyńska Szkoła Higieny i Medycyny Tropikalnej, Londyn, Wielka Brytania, dr Joanna Houghton, dr Teresa Cortes, wspólne zaangażowanie w realizację projektu SystemTB.
4. Uniwersytet w Sussex, Brighton, Wielka Brytania, prof. Aidan Doherty, dr. Nigel Brissett, opiekunowie stażu podoktorskiego w ramach projektu Mobilność Plus III, dalsza współpraca podtrzymywana w obszarze badań nad szlakami napraw uszkodzeń DNA.
5. Instytut Chemii Organicznej i Biochemii Czeskiej Akademii Nauk, Praga, Republika Czeska, dr Iva Pichova, wspólne zaangażowanie w realizację projektu SystemTB.

6. Hiszpańska Krajowa Rada Badań Naukowych, Narodowe Centrum Biotechnologii w Madrycie, Madryt, Hiszpania, prof. Jesús Blázquez, dr Alfredo Castañeda-García, współpraca w ramach projektu Mobilność Plus III.
7. Centrum Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Tekszański w Tyler, Tyler, Teksas, USA, prof. Malini Rajagopalan\*, prof. Murty Madiraju\*, prof. Anna Kurdowska, współpraca nawiązana podczas zatrudnienia na Uniwersytecie Tekszańskim w Tyler.
8. Europejskie Laboratorium Biologii Molekularnej w Hamburgu, Niemcy, prof. Matthias Wilmanns, wspólne zaangażowanie w realizację projektu SystemTB.
9. Uniwersytet Wschodniego Piemontu, Piemont, Włochy, dr Menico Rizzi, dr Franca Rossi, wspólne zaangażowanie w realizację projektu SystemTB.
10. Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk i Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa, prof. Andrzej Dziembowski, wspólne zaangażowanie w realizację projektu SystemTB i podczas dalszego zatrudnienia w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.
11. Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław, prof. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska, mgr Marta Kołodziej, współpraca w zakresie projektu dotyczącego analizy funkcji białka Lsr-2 u *Mycobacterium*.
12. Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela, dr hab. Katarzyna Dzitko (prof. UŁ), dr hab. Bożena Dziadek (prof. UŁ), dr hab. Agnieszka Krupa, dr hab. Justyna Gatkowska (prof. UŁ) dr Karolina Rudnicka, mgr Aleksandra Góralczyk-Bińkowska, współpraca podczas zatrudnienia w Uniwersytecie Łódzkim poparta wspólnymi publikacjami naukowymi.
13. Laboratorium Biobank, Katedra Biofizyki Molekularnej, Instytut Biofizyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, dr Dominik Strapagiel (prof. UŁ), współpraca podczas zatrudnienia w Uniwersytecie Łódzkim poparta wspólnymi publikacjami naukowymi

14: Politechnika Wrocławska, Wrocław, Polska, Prof. dr hab. inż. Andrzej Trochimczuk, dr hab. inż. Konrad Szustakiewicz (prof. PWr), dr inż. Małgorzata Gazińska, współpraca w ramach realizacji projektu TEAM-NET

15: Politechnika Krakowska, Kraków, Polska, Prof. dr hab. inż. Agnieszka Sobczak-Kupiec, współpraca w ramach realizacji projektu TEAM-NET

16: Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych Sieci Badawczej Łukasiewicz, Warszawa, Polska, dr inż. Monika Biernat, współpraca w ramach realizacji projektu TEAM-NET

17: Uniwersytet Gdański, Gdańsk, Polska, Prof. dr hab. Sylwia Rodziewicz-Motowidło

18: Politechnika Łódzka, Łódź, Polska, dr hab. inż. Katarzyna Nawrotek (prof. PŁ)

*Legenda: (\*-obecnie emerytowani pracownicy)*

## **Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych**

1. Acid Fast Club – towarzystwo naukowe badań nad gruźlicą, udział w spotkaniach towarzystwa naukowego w roku 2014
2. American Society for Microbiology – jako aktywny członek towarzystwa w latach 2009-2010

## **6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.**

### **6.1 Osiągnięcia dydaktyczne**

W pracy naukowej obejmuję stanowiska badawcze, jednak staram się aktywnie uczestniczyć w prowadzeniu zajęć ze studentami. W 2011 i 2012 roku pomagałem prof.

Dziembowskiemu w prowadzeniu cyklu zajęć praktycznych z proteomiki dla studentów Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

W latach 2015-2016 uczestniczyłem, pod kierunkiem prof. Aidana Doherty, w prowadzeniu zajęć z obliczeń biologicznych dla studentów na University of Sussex, w Brighton, w Wielkiej Brytanii.

### 6.1.1 Opieka naukowa nad studentami

Karol Wołek, 2012, praca licencjacka (praca eksperymentalna), 6 miesięcy „Badanie oddziaływań między białkami zaangażowanymi w naprawę DNA u *Mycobacterium*”, Uniwersytet Warszawski, pod kierunkiem prof. Andrzeja Dziembowskiego,

Connor Beaney, 2015, praca licencjacka (praca eksperymentalna), 6 miesięcy „Characterising Rv1261c and Rv1871c as potential new players in DNA damage response pathways in *Mycobacterium tuberculosis*”, Uniwersytet w Sussex, Brighton, Wielka Brytania,

Danny Freestone, 2016, praca licencjacka (praca eksperymentalna), 6 miesięcy „Characterisation of MSMEG\_1282 as a DNA processing enzyme in *Mycobacterium smegmatis*”, Uniwersytet w Sussex, Brighton, Wielka Brytania.

### 6.1.2 Opieka naukowa nad stażystami

Urbaniak M, sierpień- wrzesień 2018, student 4-go roku Mikrobiologii, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, w ramach obowiązkowych praktyk studenckich z Uniwersytetu Łódzkiego,

Juszczyk Z, sierpień- wrzesień 2018, student 4-go roku Mikrobiologii, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, w ramach obowiązkowych praktyk studenckich z Uniwersytetu Łódzkiego,

Atanasova V, czerwiec i lipiec 2017, studentka 3-go roku medycyny, praktykantka w ramach programu wymiany stypendialnej IAESTE,

Błaszczyk E, 2009 – 2010, opieka podczas stażu w Centrum Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Tekszańskiego w Tyler, Teksas, USA. I.III.

### 6.1.3. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego

Pełnię funkcję **promotora pomocniczego** w Szkole Doktorskiej BioMedChem Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutów Polskiej Akademii Nauk w Łodzi:

2019 – obecnie      mgr Filip Gąsior, realizujący pracę doktorską w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi, przewidywany termin obrony grudzień 2023 r.

*Promotor pracy: dr hab. Anna Brzostek, prof. IBM PAN*

2019 – obecnie      mgr Paulina Rusek-Wala, realizująca pracę doktorską w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego, przewidywany termin obrony grudzień 2023 r.

*Promotor pracy: dr hab. Agnieszka Krupa*

2021 – obecnie      mgr Yaroslav Lavrynychuk, realizujący pracę doktorską w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego, ocena śródkresowa postępów wykonania pracy doktorskiej zaplanowana na wrzesień 2023 r.

*Promotor pracy: Prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela*

### 6.1.4 Szkolenia i kursy w obszarze dydaktyki

2020 „Facylitacja - jak zwiększyć efektywność pracy z grupą” warsztaty prowadzone przez dr Beatę Master w ramach serii szkoleń EDU360 (online),

2020 „Mentoring jako metoda transferu wiedzy” warsztaty prowadzone przez Annę Kaczalską w ramach EDU360 (online),

2023 szkolenie pt.: „Esej tutorski (i nie tylko) jako forma pracy w każdej dyscyplinie” prowadzone przez dr hab. Agnieszkę Dziedziczak-Foltyn, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska,

2023 szkolenie pt.: „Tutoring akademicki - potencjał personalizacji kształcenia, warsztat i narzędzia tutorskie” prowadzone przez dr N. Ratajczyk i dr A. Wolańska-Kamińska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska,

2023 szkolenie pt.: „Tutoring - od czego zacząć?” prowadzone przez dr hab. Agnieszkę Dziedziczak-Foltyn, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska,

2023 szkolenie pt.: „Rozwijanie umiejętności studiowania w ramach tutoringu” prowadzone przez dr hab. Agnieszkę Dziedziczak-Foltyn, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska,

2023 szkolenie pt.: „Wykorzystanie aktywizujących metod nauczania w kształceniu akademickim” prowadzone przez dr Annę Jasińską, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska,

2023 szkolenie pt.: „Nowoczesne narzędzia i aplikacje w nauczaniu” prowadzone przez dr Annę Jasińską, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska.

## **6.2 Aktywność popularyzatorska**

### **Wykłady poza konferencjami naukowymi:**

30.05.2023 Rudnicka K., Płociński P. popularno-naukowy wykład „Mikrobiologiczni Kreatorzy Smaku, czyli kto tak naprawdę rządzi w kuchni” kierowany do słuchaczy Łódzkiego Uniwersytetu Trzeciego Wieku im. Heleny Kretz

10.01.2023 Rudnicka K., Płociński P. popularno-naukowy wykład „Co wiemy o szczepionkach przeciwko Covid-19?” kierowany do słuchaczy Łódzkiego Uniwersytetu Trzeciego Wieku im. Heleny Kretz

2.12.2022 **Płociński P.**, Włodarczyk M., Lavrynychuk Y. warsztaty dla uczniów SP199 w Łodzi w ramach Festiwalu Nauki i Techniki organizowanego w tej szkole „Z czym się je białko (w laboratorium)?”

15.04.2021 r. Rudnicka K., **Płociński P.** popularno-naukowy wykład on-line „Co wiemy o szczepionkach przeciwko Covid19?” kierowany do rodziców dzieci zrzeszonych w Łódzkim Uniwersytecie Dziecięcym Politechniki Łódzkiej,

06.11.2017 r. **Płociński P.** „Badanie udziału białek degradosomu RNA w regulacji metabolizmu prątków gruźlicy”, w auli Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk, Łódź

17.12.2013 r. **Płociński P.** „RNA decay machinery in mycobacteria” w audytorium prof. Gajewskiego, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa,

### ***Przed uzyskaniem stopnia doktora***

Udział w organizacji konferencji naukowej „Epidemia ptasiej paniki”, poświęconej ptasiej grypie (16.12.2005), Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź;

Koordinacja działań sekcji mikrobiologicznej działającej przy Kole Biologów Uniwersytetu Łódzkiego w ramach projektu: „Badanie czystości mikrobiologicznej powietrza w budynku zwierzętarni Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska” (2006).

## **7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej**

### **7.1 Specjalistyczne kursy i pełnione funkcje**

2023 – certyfikowane szkolenie stacjonarne dla badaczy i zespołów badawczych „Prowadzenie badań klinicznych zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Klinicznej” Brillance, Clinical Research W Krakowie, Polska,

2019 kurs krystalografii białek „Prot XRD” Instytut Katalizy I Fizykochemii Powierzchni Im Jerzego Habera Pan W Krakowie, Polska, kurs potwierdzony certyfikatem

2018, udział w szkoleniu w zakresie bezpiecznego użytkowania substancji radioaktywnych w Centralnym Laboratorium Ochrony Radiologicznej, w Warszawie, zakończony egzaminem na uzyskanie uprawnień Inspektora Ochrony Radiologicznej (IOR-1) przeprowadzonym przez Państwową Agencję Atomistyki w Warszawie, Polska,

2016, uczestnictwo w szkoleniu „Fundamentals of CRISPR-Cas9 gene editing”, które odbyło się w Centrum Dydaktycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,

2011, uczestnictwo w praktycznym kursie EMBO, w zakresie badań proteomicznych z wykorzystaniem spektrometrii mas, kurs potwierdzony certyfikatem,

Od lipca 2018 roku pełnię funkcję Inspektora Ochrony Radiologicznej IOR-1 w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi.

14.08.2023 r.

data

Przemysław Płociński

podpis

## Appendix 2: Summary of Professional Accomplishments

**“Identification of bacterial protein complexes of key importance for the physiology and development of antibiotic resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, based on the study of protein-protein or protein-nucleic acid interactions”**

**Dr Przemysław Adam Płociński**  
Faculty of Biology and Environmental  
Protection  
**University of Lodz, Poland**

## 1. Name

Przemysław Adam Płociński

<https://orcid.org/0000-0002-6623-3494>

## 2. Diplomas, degrees conferred in specific areas of science or arts, including the name of the institution which conferred the degree, year of degree conferment, title of the PhD dissertation

**2012** postgraduate studies in "Informatics", diploma, Faculty of Mathematics and Computer Science, University of Lodz, Lodz, Poland,

**2011** **PhD degree in medical sciences,**  
discipline: medical biology, spec. microbiology,  
with honors,  
Institute of Medical Biology of the Polish Academy of Sciences, Lodz, Poland,

Thesis entitled: "**Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CrgA as a novel protein involved in septal cell wall synthesis**"

*Thesis advisor: Prof. dr hab. Jarosław Dziadek*

*Secondary thesis advisor: Prof. Malini Rajagopalan*

**2007** **Master of Science in Biology, spec. microbiology,**

Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Poland

Thesis entitled: "**The influence of prolactin on the replication of *Toxoplasma gondii* in vitro**"

*Thesis advisor: Prof dr hab. Henryka Długońska*

### 3. Information on employment in research institutes or faculties/departments or school of arts

- 2020 – currently**     **adjunct** professor in the Department of Immunology and Infectious Biology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Łódź, Poland.
- 2016 — currently**     **adjunct** professor in the Laboratory of *Mycobacterium* Genetics and Physiology, at the Institute of Medical Biology of the Polish Academy of Sciences, Łódź, Poland,
- 2014**                     **research assistant** in the Division of Mycobacterial Research, at the National Institute for Medical Research, London, the U.K. 6 months (from January until end of June)
- delegated from the Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences, in Warsaw, Poland, on pay-free leave,*
- 2014 – 2016**             **biologist** in the Laboratory of RNA Biology and Functional Genomics, at the Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences, in Warsaw, Poland, *on pay-free leave,*
- 2010 - 2013**             **research assistant** in the Laboratory of RNA Biology and Functional Genomics, at the Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences, in Warsaw, Poland,
- 2007 - 2010**             **research assistant** at The University of Texas, Health Science Center at Tyler, Tyler, Texas, USA.

## **4. Description of the achievements, set out in art. 219 para. 1 point 2 of the Act**

### **4.1 Title of the Achievement:**

**“Identification of bacterial protein complexes of key importance for the physiology and development of antibiotic resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, based on the study of protein-protein or protein-nucleic acid interactions”**

### **4.2. List of publications constituting a scientific achievement included in this habilitation thesis**

The scientific achievement is a series of five first-author, single-subject scientific publications, describing the results of experimental work carried out in a multi-centre framework as part of international cooperation and during long-term internships in foreign research centers. Due to the collective nature of the studies, the contributions of individual authors have been documented in Appendix No. 4 to the submitted application. Copies of publications constituting the habilitation achievement are attached in the form of attachment no. 5 to the application for conducting the procedure for the award of the degree of habilitated doctor.

Works constituting a scientific achievement describe the identification of previously undescribed protein complexes or supplementing the identification of protein complexes with new, previously unknown components for multi-protein enzyme systems present in *Mycobacterium tuberculosis* cells: the cell wall synthesis complex, the RNA degradosome complex and the hitherto undescribed DNA damage repair system. The protein complexes studied are important for the survival and multiplication of pathogenic mycobacteria, are current or promising future targets for the development of anti-mycobacterial drugs, or are important in the emergence and spread of drug resistance in these bacteria.

**Series of publications included in the achievement:**

1. **Płociński P\*#**, Macios M, Houghton J, Niemiec E, Płocińska R, Brzostek A, Słomka M, Dziadek J, Young D, **Dziembowski A#**. Proteomic and transcriptomic experiments reveal an essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Research*. 2019 Apr 8. pii: gkz251. doi: 10.1093/nar/gkz251. **IF<sub>2019</sub>=11.502**; **MEiN<sub>2023</sub>=200**; citations=30;

I am the first and corresponding author of this work. I started the research during my employment at the Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences in Warsaw, continued it during my employment at the Francis Crick Institute in London, UK, and finished it by preparing a manuscript describing the results at the Institute of Medical Biology of the Polish Academy of Sciences in Łódź. In this work, I have a triple affiliation, because I conducted research in all three units under separate employment contracts. Together with Prof. Dziembowski, I prepared the research concept, conducted most of the experimental work on my own and coordinated the experimental work of the other team members. I am responsible for the analysis and interpretation of the results of the research, the development of the illustrative material and the vast majority of the content of the manuscript. My involvement also consisted in preparing responses to the reviews of the original manuscript, along with the necessary experimental supplements and depositing the source data in public transcriptomics and proteomics databases.

2. **Płociński P\***, Brissett NC, Bianchi J, Brzostek A, Korycka-Machała M, Dziembowski A, Dziadek J, **Doherty AJ#**. „DNA Ligase C and Prim-PolC participate in base excision repair in mycobacteria”. *Nature Communications*. 2017 Nov 1;8(1):1251. doi:10.1038/s41467-017-01365-y. **IF<sub>2017</sub>=12.353**; **MEiN<sub>2023</sub>=200**; citations=17;

I am the lead author of this work. Most of the research was carried out in the laboratory of Prof. Aidan Doherty, during a 2-year postdoctoral fellowship, as part of the Mobilność Plus III project. I continued my research after returning to Poland to the Institute of Medical Biology of the Polish Academy of Sciences in Łódź. In this work, I have a double affiliation, because I conducted research in both units under an employment contract and during a long-term postdoctoral fellowship. Together with

Prof. Doherty, I prepared the research concept, conducted most of the experimental work myself and coordinated the experimental work of the other team members. I am responsible for the analysis and interpretation of most of the research results, the development of illustrative material and the vast majority of the manuscript content. I was also responsible for preparing responses to reviews of the original manuscript, along with the necessary experimental supplements.

3. **Płociński P\***, Laubitz D\*, Cysewski D, Stoduś K, Kowalska K, **Dziembowski A#**. „Identification of protein partners in mycobacteria using a single-step affinity purification method”. *PLoS One*. 2014 Mar. doi:10.1371/journal.pone.0091380. **IF<sub>2014</sub>=3.234; MEiN<sub>2023</sub>=140; citations=13;**

I am the lead author of this work, together with dr hab. Daniel Laubitz. Experimental work was carried out as part of a large European project FP7-Health, bringing together several partners from all over Europe - leading scientists in tuberculosis research. Together with Prof. Dziembowski and dr hab. Laubitz I prepared the research concept with Laubitz, with whom I conducted most of the experimental work and coordinated the experimental work of the other team members. I am responsible for the analysis and interpretation of the research results, the development of illustrative material and significant fragments of the manuscript. Together with Dr. Laubitz, I was also responsible for preparing responses to the reviews of the original manuscript, along with the necessary experimental supplements.

4. **Plocinski P\***, Martinez L, Sarva K, Plocinska R, Madiraju M, **Rajagopalan M#**. „*Mycobacterium tuberculosis* CwsA overproduction modulates cell division and cell wall synthesis”. *Tuberculosis* (Edinb). 2013 Dec;93 Suppl:S21-7. doi: 10.1016/S1472-9792(13)70006-4. **IF<sub>2013</sub>=3.503; MEiN<sub>2023</sub>=100; citations=13;**

I am the lead author of this work. I started experimental work during an internship in the laboratory of Prof. Rajagopalan, at the University of Texas in Tyler and continued after returning to the country, in the laboratories of Prof. Dziembowski (IBB PAN in Warsaw) and Prof. Dziadek (IBM PAN Lodz). I participated in the development of the research concept and conducted most of the experimental work that led to the above

scientific publication. I participated in the data analysis and interpretation of the results. I am responsible for the preparation of a significant part of the illustrative material and significant parts of the manuscript content.

5. **Plocinski P\***, Arora N, Sarva K, Blaszczyk E, Qin H, Das N, Plocinska R, Ziolkiewicz M, Dziadek J, Kiran M, Gorla P, Cross TA, Madiraju M, **Rajagopalan M#**. „*Mycobacterium tuberculosis* CwsA interacts with CrgA and Wag31, and the CrgA-CwsA complex is involved in peptidoglycan synthesis and cell shape determination”. *Journal of Bacteriology*. 2012 doi: 10.1128/JB.0100512. Epub 2012 sep 21. IF2012=3.177; MEiN=140; citations=49.

I am the lead author of this work. As in the case of the work published in Tuberculosis, I started experimental work during an internship in the laboratory of Prof. Rajagopalan, at the University of Texas in Tyler and continued after returning to the country, in the laboratories of Prof. Dziembowski (IBB PAN in Warsaw) and Prof. Dziadek (IBM PAN Lodz). I participated in the development of the research concept and conducted most of the experimental work that led to the above scientific publication. I participated in the data analysis and interpretation of the results. I am responsible for the preparation of a significant part of the illustrative material and significant parts of the manuscript content.

Legend: \*first author(s), #corresponding author (s).

Total Impact Factor of publications included in the scientific achievement **IF=33,769**, total number of points from the Polish Ministry of Education and Science **MEiN=780**, total number of citations=**124** (120 without self-citations)

IF is given according to the year of publication, based on the Web of Science database (InCites Journal Citation Reports). MEiN points are given according to the unified list of awarded publications (polish scoring system) according to the most recent scoring document. Number of citations (including self-citations), according to the Web of Science Core Collection database, accessed on 4<sup>th</sup> August, 2023.

## 4.3 Description of scientific achievement

### 4.3.1 The scientific objective

**The aim of the study was to identify undescribed or partially described protein complexes of mycobacteria in order to determine their role in bacterial metabolism and to evaluate their usefulness as molecular targets for planning novel anti-mycobacterial therapies.**

### 4.3.2 Introduction

The main subject of investigation, in the studies listed as the scientific achievement for evaluation, is *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), the causative agent of tuberculosis (TB). In the year 2019, tuberculosis, being a serious infectious medical condition, had caused death of 1.4 mln people, worldwide. The disease is life-threatening in immunodeficient individuals, like people with HIV, and is thus considered one of the most common direct causes of death in HIV positive individuals, with almost 15% of all people dying from tuberculosis in 2019, being HIV positive (1). It is believed that up to one fourth of the human population is currently infected with *M. tuberculosis*, but the symptomatic disease will only occur in 5-10% of all infected cases, and is often triggered by states of immunodeficiency (2). Tuberculosis is an airborne disease, with typical location of the lesions in the lungs of an infected person (3). During the course of infection, typically, the tubercle bacilli are engulfed by the macrophages of the alveoli and induce immune response that leads to isolation of bacteria in characteristic structures called granulomas. According to the data of the Institute of Tuberculosis and Lung Diseases in Warsaw, in 2021, about 3,704 people fell ill with tuberculosis in Poland, which was 314 cases more than in 2020, when 474 people died as a result of the disease, constituting a significant percentage of deaths due to all infectious and parasitic diseases (4). The epidemiological situation has deteriorated due to the co-existing Covid-19 pandemic in recent years, which resulted in limited access to health care services and had a negative impact on the diagnosis and treatment of tuberculosis infections.

Currently used tuberculosis treatment regimen is considered effective against mycobacterial strains tested to be antibiotic sensitive. According to the Guidelines of the Polish Pulmonary Association, the treatment of primary tuberculosis infections in Poland includes an initial two-months-long phase of intensive treatment with four first-line anti-tuberculosis drugs: isoniazid (INH), rifampicin (RIF), pyrazinamide (PZA) and ethambutol (EMB) or streptomycin (STR). The treatment is then continued for a period of at least four months with INH and RMP (3). In the last years, there is more and more occurrences of the drug-resistant and multi-drug-resistant tuberculosis strains, which led many researchers to investigate possible alternative treatment options and to evaluate novel drug targets in the mycobacterial cells. On the other hand, it is important to study and to understand the mechanisms of drug resistance via precise description of function of the intracellular drug targets for the currently used chemotherapeutics, and to study the DNA repair mechanisms that may lead to accelerated rates of acquiring drug resistance in mycobacteria.

The availability of the *M. tuberculosis* genome (since 1998(5)), associated protein annotation as well as advances in the proteomic and structural studies of this important pathogen had caused significant progress in characterization of novel, potential targets for anti-TB therapies development. The cornerstone of finding potent targets for future therapies were the tests of gene essentiality, mainly done via transposon mutagenesis (6, 7), that tested the essentiality of individual genes for the bacterial growth and survival. Thanks to these tests, during the last decade, there was a wave of studies focusing on therapeutic interventions targeted on inactivation of essential proteins. An ideal drug target is considered to be a protein or a molecule that is able to bind and be inactivated by small molecules, antibodies or recombinant proteins. It is important that the target protein is absent or differs significantly from a potential orthologue that might be present in the human host's cell. Due to this precaution, for mycobacteria as well as for other bacteria, the cell wall metabolism is considered a potent drug target.

The mechanism of action of most currently used antibiotics is based on the inhibition of bacterial cell wall synthesis. Unfortunately, *Mycobacterium tuberculosis* is characterized by a unique architecture of cell wall construction and in this respect differs significantly from other bacteria, which means that the treatment of tuberculosis and other mycobacteriosis requires specialized and targeted therapeutic approaches. My

research on the key protein complexes of *Mycobacterium tuberculosis* included research on the protein complex involved in the synthesis of the mycobacterial cell wall (Part 1) and the complexes involved in RNA degradation and DNA damage repair (Part 2).

### 4.3.3 Part 1

#### **The aim of basic research:**

To characterize the intracellular role of a protein from *M. tuberculosis*, encoded by the *rv0008c* gene, in the context of its probable involvement in the process of the mycobacterial cell wall synthesis and antibiotic resistance.

#### **Practical issue:**

Cell wall synthesis as a target for anti-tuberculosis therapies.

The unique composition of the mycobacterial cell wall is one of the natural barriers, that confer the natural resistance to many classically used antibiotics. The structure contains long, branched fatty acids, so called mycolic acids, characteristic to mycobacteria and related species. They are responsible for impaired permeability of the cell wall to many chemicals, impairing penetration of antibiotics and lowering the efficiency of many anti-tuberculosis therapies. Mycolic acids are considered virulence factors and play a role in immunomodulation of the host response to infection, supporting the intracellular survival of the bacterium. Mycolic acids synthesis pathway is currently targeted for tuberculosis treatment with the use of Isoniazid, first-line anti-TB drug, routinely used to treat tuberculosis worldwide. Thus, synthesis of the cell wall and mycolic acids is believed to be amongst the most promising therapeutic targets for novel effective therapeutic avenues to treat TB infections (8).

The cell wall synthesis occurs in the cell in specific compartments: at cell poles during the vegetative growth, and at the mid-cell during the cell division. The cell division and cell wall synthesis associated with bacterial multiplication are fragile and essential processes, necessary for successful survival and expansion of the bacterium. This makes them useful for researching valuable drug targets for novel anti-TB drug discovery. The cell division occurs right after the replication of the bacterial chromosome, during the cell cycle, and it partially overlaps with DNA segregation to the opposite cell poles. The

process of bacterial cell division complex formation is possible thanks to the activity of FtsZ protein, that is a dynamic element of the cytoskeleton and possesses the self-activating GTPase properties. The FtsZ protein is capable of forming the division ring that is positioned at mid-cell via complicated regulatory mechanisms (9, 10). The polymerization of FtsZ is a dynamic process, which can be triggered in vitro, by adding GTP to purified, concentrated and appropriately buffered FtsZ protein. The FtsZ filaments bind together to form a ring-like structure, that is positioned just underneath the cell membrane (11). FtsZ filaments are normally stabilized and attached to the cell membrane via stabilizing and anchoring proteins — FtsA and ZipA, in *Escherichia coli* (*E. coli*). The growing ring requires co-operative and sequential action of several proteins in order to synthesize the division compartment that will become new poles of dividing daughter cells upon coordinated cell wall hydrolysis, necessary for separation of cells. The counteractive synthesis and hydrolysis activities require complicated orchestration, thus the order of protein recruitment to the growing ring is essential for the overall successful division. Any perturbations may result in cell division block or cell lysis and cell death (12).

Mycobacteria, like in other Actinomycetales, lack a number of cell division proteins that are otherwise present in many other model bacterial organisms like *E. coli* or *Bacillus subtilis*. The anchoring and stabilizing proteins: FtsA, ZipA and ZapA are absent. One cannot identify the MinCDE protein complex, that is used by other bacteria to position the FtsZ division ring at mid-cell for proper cell division. Direct homologues of FtsZ-ring destabilizing proteins EzrA and Sula are also absent in mycobacteria.

In the work published in the Journal of Bacteriology, thanks to the use of the bacterial two-hybrid test (b2h) technique, I showed that the CrgA protein from *M. tuberculosis* has the ability to interact with FtsZ and is part of the divisome complex (13). The discovery of the role of CrgA in mycobacterial cells was the subject of my doctoral thesis, for which I conducted research at the University of Texas in Tyler, USA in the group of prof. Malini Rajagopalan. In turn, the identification of the role of CwsA in mycobacterial cells, described in the paper: [Plocinski P, Arora N, Sarva K, Blaszczyk E, Qin H, Das N, Plocinska R, Ziolkiewicz M, Dziadek J, Kiran M, Gorla P, Cross TA, Madiraju M, Rajagopalan M "Mycobacterium tuberculosis CwsA interacts with CrgA and Wag31, and the CrgA-CwsA complex is involved in peptidoglycan synthesis and cell shape determination"](#) in the Journal of Bacteriology, in cooperation between the group of Prof.

Malini Rajagopalan from the University of Texas at Tyler and from the laboratory headed by Prof. Jarosław Dziadek at the Institute of Medical Biology of the Polish Academy of Sciences in Łódź. Initially, I observed that the gene encoding the CwsA protein (rv0008c) is located on the tuberculosis genome in the vicinity of genes for other proteins involved in the processes of cell division and the synthesis of cell wall elements, the aforementioned CrgA, the peptidoglycan polymerase complex: PbpA and RodA, and kinases involved in the regulation of the process. cell division PknA and PknB. Proximity on the genome and studies of interactions between proteins using b2h techniques and the co-precipitation technique (called pull-down) using recombinant, purified proteins allowed me to identify the interaction in the mycobacterial cell between the CrgA and CwsA proteins. Thanks to the study of interactions between proteins, I characterized the small protein CwsA with a transmembrane domain in the context of its role in mycobacterial cells as a component of a protein complex involved in the coordination of cell division and peptidoglycan synthesis.

\*\*\*\*\*



## ***Mycobacterium tuberculosis* CwsA Interacts with CrgA and Wag31, and the CrgA-CwsA Complex Is Involved in Peptidoglycan Synthesis and Cell Shape Determination**

P. Plocinski,<sup>a\*</sup> N. Arora,<sup>a</sup> K. Sarva,<sup>a</sup> E. Blaszczyk,<sup>a</sup> H. Qin,<sup>c</sup> N. Das,<sup>c</sup> R. Plocinska,<sup>a\*</sup> M. Ziolkiewicz,<sup>b</sup> J. Dziadek,<sup>b</sup> M. Kiran,<sup>a</sup> P. Gorla,<sup>a</sup> T. A. Cross,<sup>c</sup> M. Madiraju,<sup>a</sup> and M. Rajagopalan<sup>a</sup>

The University of Texas Health Science Center at Tyler, Biomedical Research, Tyler, Texas, USA<sup>a</sup>; Institute of Medical Biology, Polish Academy of Sciences, Lodz, Poland<sup>b</sup>; and The National High Magnetic Field Lab and the Department of Chemistry and Biochemistry, Florida State University, Tallahassee, Florida, USA<sup>c</sup>

**Bacterial cell division and cell wall synthesis are highly coordinated processes involving multiple proteins. Here, we show that Rv0008c, a novel small membrane protein from *Mycobacterium tuberculosis*, localizes to the poles and on membranes and shows an overall punctate localization throughout the cell. Furthermore, Rv0008c interacts with two proteins, CrgA and Wag31, implicated in peptidoglycan (PG) synthesis in mycobacteria. Deletion of the Rv0008c homolog in *M. smegmatis*, MSMEG\_0023, caused bulged cell poles, formation of rounded cells, and defects in polar localization of Wag31 and cell wall synthesis, with cell wall synthesis measured by the**

\*\*\*\*\*



## *Mycobacterium tuberculosis* CwsA overproduction modulates cell division and cell wall synthesis

P. Plocinski<sup>a</sup>, L. Martinez<sup>a</sup>, K. Sarva<sup>a</sup>, R. Plocinska<sup>a</sup>, M. Madiraju<sup>a</sup> and M. Rajagopalan<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Biomedical Research, The University of Texas Health Science Center @ Tyler, Tyler, TX 75708, USA

### KEYWORDS

Mycobacterium  
FtsZ  
CwsA  
Cell wall synthesis  
Cell division

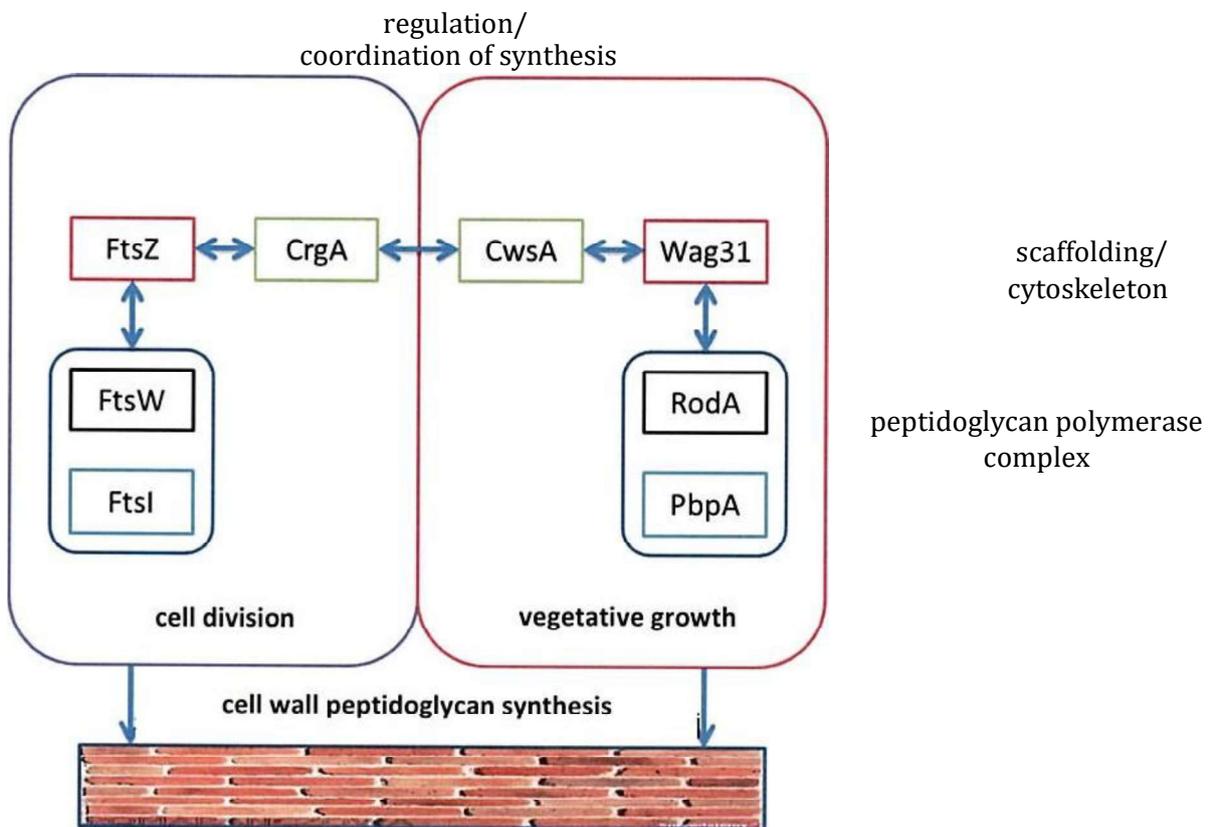
### ABSTRACT

We recently showed that two small membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*, CwsA and CrgA, interact with each other, and that loss of CwsA in *M. smegmatis* is associated with defects in the cell division and cell wall synthesis processes. Here we show that CwsA overproduction also affected growth, cell division and cell shape of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*. CwsA overproduction in *M. tuberculosis* led to increased sensitivity to cefsulodin, a penicillin-binding protein (PBP) 1A/1B

B2h protein-protein interaction screening led me to identify Wag31 as an important partner of interactions with CwsA. Wag31 is a structural element of the bacterial cytoskeleton that forms a scaffold for the peptidoglycan synthesis machinery at the mycobacterial cell pole. Both proteins localized to the cell poles and the removal of CwsA resulted in problems with the formation of Wag31 structures. Both overproduction or depletion of CwsA caused significant changes in the morphology of mycobacterial cells, with now presenting bulged or roundish shapes, rather than being typical rods.

While continuing my research on CwsA, I observed that the overproduction or removal of the CwsA protein from mycobacterial cells caused abnormalities in the morphology of cells visible under the microscope, which more often assumed a distended shape instead of maintaining a rod-like shape. On the other hand, the overproduction of CwsA in *E. coli* led to the complete loss of the rod-like shape by these bacteria, transforming into circular cells, which eventually underwent rupture and lysis. This observation became the basis for the research described in the paper published in the journal *Tuberculosis*: [Plocinski P, Martinez L, Sarva K, Plocinska R, Madiraju M, Rajagopalan M. "Mycobacterium tuberculosis CwsA overproduction modulates cell division and cell wall synthesis"](#). Importantly, the overexpression of CwsA in *M. tuberculosis* caused a significant sensitization of mycobacteria to the class III cephalosporin — cefsulodin, measuring the growth inhibition zone with antibiotic disc

diffusion method. According to the literature, cefsulodin is selectively blocking the Pbp IA/IB proteins, main peptidoglycan synthesis associated penicillin binding proteins. The sensitivity of mycobacteria to cephalexin, ceftiofur, imipenem, vancomycin and D-cycloserine was not affected by the overexpression of CwsA, which may indicate that a single specific process that is sensitive to cefsulodin, requires CwsA activity. Due to the fact that the gene for CwsA protein is located next to the PbpA- and RodA-expressing operon, it is highly probable that the protein is involved in the peptidoglycan synthesis and that CwsA and Wag31 are engaged in the same process in the cell. Predicted dependencies amongst cell wall synthesis and cell division proteins in mycobacteria are depicted in Figure 1.



**Figure 1.** The role of CwsA in the regulation of the cell wall peptidoglycan synthesis process in mycobacterial cells. *Legend: z ang. CwsA – cell wall synthesis protein A, Pbp - penicillin binding protein, fts - filamenting temperature-sensitive proteins, crgA - coordinating reproductive growth protein A*

### The most important achievements of this part:

1. The discovery and characterization of Rv0008c protein, from now on described as the CwsA protein (cell wall synthesis protein A) as a protein associated with the cell wall synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*
2. The identification of the protein-protein interaction between the CwsA and a scaffolding protein Wag31 and testing the direct effect of CwsA on the peptidoglycan synthesis complex in mycobacteria
3. The observation of sensitization of *M. tuberculosis* to cefsulodin, associated with overexpression of CwsA, proving the intracellular levels of CwsA protein may impact the antibiotic resistance profile of mycobacteria.

### Possible practical use of basic research:

The bacterial proteins associated with the process of cell division and cell wall synthesis are considered good therapeutic targets. The improved understanding of the mechanisms of the regulation of cell division and cell wall synthesis may help us to plan effective strategies to combat mycobacterial infections. Recently described chemical, with good anti-tuberculosis properties, APYS1, is thought to disturb the interaction between Wag31 and CwsA proteins, as a mechanism that leads to severe morphological changes in the shape of the growing cell pole, that eventually leads to cell lysis (14). The reported phenotypic changes associated with APYS1 mycobacteriocidal activities closely resemble the phenotypes associated with overproduction of CwsA seen in my work.

### 4.3.4 Part 2

**The aim of basic research:** To characterize the intracellular roles of chosen protein complexes from *M. tuberculosis*, participating in the nucleic acids metabolism, in the context of the synthesis and degradation of RNA and the DNA damage repair.

**Practical issue:** Elements of nucleic acids metabolism as targets for anti-tuberculosis therapies.

Mycobacteria, just like any organism, must replicate their genetic material in the process of DNA replication, transcribe the DNA into RNA, during transcription, and

translate RNA into proteins in the process of translation. The basic mechanisms of all these processes are the same in all living cellular organisms. On the molecular level, however, one can find significant differences between bacteria and eukaryotic cells. This gives the opportunity to apply chemotherapeutics that specifically block such key cellular processes, exclusively in the bacterial cell, without harming the human host's cells. Currently, there are number of different antibiotics available to hinder the process of translation in bacteria, giving the chance to control the infection and to eradicate bacteria causing the disease. During the life cycle, any living cell produces and turns over huge amounts of RNA. The RNA synthesis in the cell is carried by the DNA-dependent RNA polymerase multiprotein complex, with the ability to bind to DNA. Rifampicin, a first-line anti-tuberculosis drug used to treat tuberculosis as well as leprosy, has the ability to specifically block the RpoB subunit of the mycobacterial RNA polymerase. Mutations in the RpoB coding gene are known to be associated with developing resistance to rifampicin. Research in the areas of RNA metabolism and mechanisms of acquiring drug resistance in bacteria are amongst top priorities in mycobacterial research, worldwide.

In the manuscript from 2014, being a part of the habilitation dissertation given to evaluation, I optimized the method for identification of protein-protein interactions that exploited the purification of protein complexes with the use of affinity chromatography coupled with mass spectrometry analysis.

In the 2014 paper Płociński P, Laubitz D, Cysewski D, Stodur K, Kowalska K, Dziembowski A. "Identification of protein partners in mycobacteria using a single-step affinity purification method" from PloS One, which is part of the scientific achievement, the method of identification of interactions between proteins was optimized by purification of protein complexes using affinity chromatography coupled with mass spectrometry. I conducted research during my employment at the Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences, in the group of Prof. Dziembowski, as part of multi-center cooperation in the "SystemTB" FP7-Health project, funded by the European Commission.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

## Identification of Protein Partners in Mycobacteria Using a Single-Step Affinity Purification Method



Przemysław Płociński<sup>1,9</sup>, Daniel Laubitz<sup>1,9</sup>, Dominik Cysewski<sup>1</sup>, Krystian Stodus<sup>1</sup>, Katarzyna Kowalska<sup>1</sup>, Andrzej Dziembowski<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warszawa, Poland, <sup>2</sup>Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Warsaw, Poland

### Abstract

Tuberculosis is a leading cause of death in developing countries. Efforts are being made to both prevent its spread and improve curability rates. Understanding the biology of the bacteria causing the disease, *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), is thus vital. We have implemented improved screening methods for protein–protein interactions based on affinity purification followed by high-resolution mass spectrometry. This method can be efficiently applied to both medium- and high-throughput studies aiming to characterize protein–protein interaction networks of tubercle bacilli. Of the 4 tested epitopes FLAG, enhanced green fluorescent protein (eGFP), protein A and haemagglutinin, the eGFP tag was found to be most useful on account of its easily monitored expression and its ability to function as a simultaneous tool for subcellular

One of the key protein complexes under investigation was the DNA-dependent RNA polymerase. The method was initially optimized on *Mycobacterium smegmatis* (currently renamed to *Mycobacterium smegmatis*), a saprophytic cousin of *M. tuberculosis*, often used as a model to study chosen cellular processes in mycobacteria. The study was later expanded to *M. bovis* BCG, a laboratory strain of bovine tuberculosis. Four different protein tags were used to be tested as fusion proteins, enabling subsequent purification of protein complexes on resins coated with specific antibodies against the tags used. Out of four tags: FLAG, eGFP (enhanced green fluorescent protein), hemagglutinin and protein A, the eGFP tag was chosen as the optimal one, with good purification yield, low cost of the resin and low level of background contamination. RpoA, one of the subunits of the RNA polymerase complex was tested as the bait to purify the entire holoenzyme. Due to the size of eGFP tag, which is relatively large and could interfere with the folding or functionality of the tagged protein, the intracellular localization of the protein had also been tested. In agreement with its natural ability to bind DNA, the RpoA-eGFP protein co-localized with the bacterial chromosome. Thus, the use of eGFP was not only good for efficient purification of protein complexes, but also allowed to visualize the intracellular localization of tested bait proteins, or entire complexes. The protein complex purification method allowed to purify significant amounts of the DNA-dependent RNA polymerase and to characterize the surface of

interaction between individual constituents of the protein complex with the use of cross-linker, that could be mapped from ms spectra.

The half-life of RNA molecules is relatively very short — on average it is around few to several seconds. All RNA molecules that are containing any errors or are no longer needed by the cell must undergo degradation to allow coordinated growth and survival of the cell (15). The process of RNA degradation is carried out by the RNA degradosome complex. This essential complex participates in the processes like: maturation of RNA molecules, influencing the transcriptional proficiency status of mRNA transcripts, small RNA and antisense RNA mediated transcriptional regulation, activation/inactivation of riboswitches and transcriptional anti-terminators. Impairment of the maturation or degradation of RNA may have very serious consequences for the cell survival and blocking these processes often leads to cell death. The process of RNA elimination and associated with it recycling of nucleotides is also key to adaptation to changing environment, when global changes in transcriptomes are necessary to gain new abilities or functions. Adaptation is considered amongst the main mechanisms that allow mycobacteria to switch from actively growing forms to latent, metabolically silent forms, as well as to reactivate to grow and multiply, when the conditions improve. Recently, there was a manuscript published documenting the use of small molecule chemicals to inhibit the activity of one of the an essential mycobacterial ribonuclease — RNase E. Importantly, the second essential ribonuclease involved in global RNA degradation in the mycobacterial cell — PNPase (polynucleotide phosphorylase), has been recently recognized as a molecular target for pyrazinoic acid, an active metabolite of pyrazinamide. Mutations in the gene encoding PNPase were associated with resistance of mycobacteria to pyrazinamide (16). With the use of the protein complex purification methodology, exploiting affinity purification coupled with mass spectrometry, in the work from 2019: [Płociński P, Macios M, Houghton J, Niemiec E, Płocińska R, Brzostek A, Słomka M, Dziadek J, Young D, Dziembowski A. „Proteomic and transcriptomic experiments reveal an essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of \*Mycobacterium tuberculosis\*”](#), I was able to characterize the RNA degradosome complex in *Mycobacterium tuberculosis*, published in the high-impact journal Nucleic Acids Research.

## Proteomic and transcriptomic experiments reveal an essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*

Przemysław Płociński<sup>1,2,3,\*</sup>, Maria Macios<sup>1</sup>, Joanna Houghton<sup>2</sup>, Emilia Niemiec<sup>1</sup>,  
Renata Płocińska<sup>3</sup>, Anna Brzostek<sup>3</sup>, Marcin Słomka<sup>4</sup>, Jarosław Dziadek<sup>3</sup>, Douglas Young<sup>2</sup>  
and Andrzej Dziembowski<sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Pawińskiego 5A, Warsaw 02-106, Poland, <sup>2</sup>Mill Hill Laboratory, Francis Crick Institute, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, UK, <sup>3</sup>Institute of Medical Biology, Polish Academy of Sciences, Lodowa 106, Łódź 93-232, Poland, <sup>4</sup>Biobank Lab, Department of Molecular Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Piłarskiego 14/16, Łódź 90-231, Poland and <sup>5</sup>Institute of Genetics and Biotechnology, University of Warsaw, Pawińskiego 5A, Warsaw 02-106, Poland

Received December 06, 2018; Revised March 25, 2019; Editorial Decision March 26, 2019; Accepted April 02, 2019

In the above-mentioned study, I was able to identify the constituents of the core RNA degradosome in *M. tuberculosis*, which is formed by two essential ribonucleases: RNase E and PNPase, as well as by the non-essential RNA helicase — RhLE. Additional proteins associated with the RNA degradosome complex included a non-essential ribonuclease RNase J and two RNA chaperones - CspA and CspB proteins, likely influencing the RNA folding. Not only I was the first person to show the composition of the RNA degradosome in mycobacteria, but I also developed a novel method to study protein- RNA interactions on the global scale. Due to the fact that the mycobacterial RNA is not efficiently poly-adenylated, the classical methods used to study protein-RNA association are not applicable for this organism as they rely on binding of the polyadenylated RNA to oligo-poly-dT coated beads. As an alternative, the method developed here relied on the ability of mycobacteria to transport and incorporate a photoactivatable analog of a nucleotide uridine — 4-thiouridine. This nucleotide was incorporated into the intracellular pool of RNA by the DNA-dependent RNA polymerase, once transported inside the *M. bovis* cells. It was then photo-activated with the UV light at 365nm, causing the nucleotide to form covalent cross-links between the RNA and interacting proteins. Next, the protein-RNA complexes were purified using affinity chromatography on an ion exchange column, the complexes were recovered, digested with trypsin and subjected to mass spectrometry analysis. Thanks to developing that

approach, I was able to show that the RNA degradosome elements, mainly RNase E, RNase J, PNPase and RhlE interact with RNA *in vivo*, because the mass spectra were dominated by the peptides mapping to those proteins in protein-RNA complexes. Additionally, by exploiting of global RNA sequencing, with the use of Illumina technologies, I was able to identify the pool of RNA molecules that are affected by the alteration of RNA degradosome enzymes RNase E and PNPase, which were down-regulated by the mycobacterial Cas9/CRISPR system. Most of the above-described experiments were carried out as a collaboration between three institutions: 1) The Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences, in Warsaw, 2) The National Institute for Medical Research MRC, in London, 3) The Institute of Medical Biology of the Polish Academy of Sciences, in Lodz, Poland. Thanks to that research we now documented the composition and function of the RNA degradosome in *M. tuberculosis*. This is particularly important, in the context of possible use of RNA degradosome constituents as drug targets, for future therapeutic interventions, as well as for improved understanding of the antimicrobial activity of pyrazinamide, the first-line anti-tuberculosis drug used to treat the disease.

The analysis of the protein complexes with the use of affinity chromatography coupled with mass spectrometry appeared very helpful for the studies of DNA damage repair in mycobacteria. These processes are directly linked to the phenomena of genetic diversity, mutagenesis and acquiring drug-resistance by the bacterium. In the previously mentioned work published in PLOS One, in 2014, I used the elements of the nucleotide excision repair pathway to be able to track, in real time, the process of DNA damage repair inside the mycobacterial cell. Using the UvrA-eGFP fusion protein as bait, expressed in *M. bovis*, I was able to confirm the formation of DNA integrity scanning complex UvrA-UvrB. When inducing the DNA damage by exposing the cells to UV light at 254 nm, the scanning complex quickly dissociated, within 5 minutes after exposure and re-associated within 30 minutes following the exposure to UV, inducing DNA damage. The technique presented here was proven useful to study dynamic processes involving activity of protein complexes, while carrying their physiological roles inside the cell in real time.

The same methodology to study protein-protein interactions was found very valuable for the prediction of function of elements of the operon LigC- Prim-PolC, engaged in the processes of DNA damage repair in the manuscript [Płociński P, Brissett NC, Bianchi J, Brzostek A, Korycka-Machała M, Dziembowski A, Dziadek J, Doherty AJ, „DNA Ligase C and Prim-PolC participate in base excision repair in mycobacteria”](#). In the high-impact

journal — Nature Communications, I and co-workers were able to document, for the first time, the activity of an ATP-dependent DNA ligase — LigC and associated with it primase/polymerase from the AEP (archaeo-eukaryotic primase/polymerase) in the bacterial base excision repair (BER) pathways.



ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-017-01365-y

OPEN

## DNA Ligase C and Prim-PolC participate in base excision repair in mycobacteria

Przemysław Płociński<sup>1,2</sup>, Nigel C. Brissett<sup>1</sup>, Julie Bianchi<sup>1,4</sup>, Anna Brzostek<sup>2</sup>, Małgorzata Korycka-Machała<sup>2</sup>, Andrzej Dziembowski<sup>3</sup>, Jarosław Dziadek<sup>2</sup> & Aidan J. Doherty<sup>1</sup>

Prokaryotic Ligase D is a conserved DNA repair apparatus processing DNA double-strand breaks in stationary phase. An orthologous Ligase C (LigC) complex also co-exists in many

\*ARTICLE IN PRESS

LigC protein and Prim-PolC, as well as with the BER system elements: endonuclease IV, both paralogues of exonuclease III (ExoIII and XthA) and glycosylases FPG and MPG. In addition to protein-protein interaction studies, I was able to determine the substrate specificity of both Prim-PolC and LigC with the use of DNA binding assay EMSA, measuring retardation of DNA-protein complexes in polyacrylamide gels. DNA extension and DNA ligation assays were also carried out to confirm the observed substrate specificity for both enzymes and they were carried out using DNA substrates mimicking the DNA damage intermediates normally repaired via BER system. Numerous proteins from the BER system were purified as recombinant enzymes for this work, and this allowed to reconstitute the complete DNA repair pathway *in vitro*. For that purpose, oligonucleotide DNA substrates containing a typical BER damage, 8-oxo-guanine, in the central part of the oligonucleotide, were initially interacted with the FPG glycosylase, followed by treatment with endonuclease IV (alternatively exonuclease III), Prim-PolC

and LigC. Thanks to the individual activities of the recombinant enzymes, the DNA damage was completely repaired with sequential removal of the damaged nucleotide, dephosphorylation of 3'-end of the site of DNA damage, fill-in reaction carried out by Prim-PolC and eventual ligation of the now repaired fragment with the activity of LigC. This resulted in the recovery of DNA strand continuity and integrity. Prim-PolC was also purified in large quantities as recombinant protein, by subsequent use of nickel metal ion affinity chromatography (allowing binding of poly-histidine tag of the protein to the nickel coated agarose beads), ion exchange chromatography and gel filtration chromatography. High-purity protein was able to form protein crystals in a few out of hundreds of crystallization conditions tested, including one condition designed for protein-DNA co-crystallization. Eventually, both the apoenzyme as well as the DNA and cofactor bound enzyme forms were crystalized and the corresponding structures were solved. This is particularly important in the context of our understanding of the role of Prim-PolC and related AEP enzymes in the mycobacterial cell, as this may help with planning specific inhibitors to block the enzymatic activities of this class of enzymes. *Mycobacterium tuberculosis* encodes the information for four such enzymes, which are all considered error-prone and responsible for introducing mutations at relatively high rate, influencing the genetic diversity of the bacterial population and potentially also participating in the process of acquiring resistance to antibiotics.

The above-described manuscripts being a part of the scientific achievement all provide important pieces of knowledge about protein complexes, protein-protein and protein-nucleic acids interactions that are key to survival and multiplication of the human pathogen — *Mycobacterium tuberculosis*.

**The most important achievements of this part:**

1. The discovery and characterization of the RNA degradosome protein complex, essential for RNA metabolism in mycobacterial cells,
2. Description of the pool of transcripts, that change significantly in mycobacterial cells with altered levels of the essential RNA degradosome constituents,

3. The discovery and characterization of roles of LigC and Prim-PolC protein complex in the DNA repair pathways in acid fast mycobacteria, as a new branch of the base excision repair,
4. Solution of the crystal structure of the Prim-PolC apoenzyme and in complex with the DNA substrate.

#### **Possible practical use of basic research:**

PNPase and RNase E are absolutely essential for the survival of mycobacterial cells and are considered good therapeutic targets for planning future anti-tuberculosis interventions. The above-described research contributes significantly to our understanding of their roles in mycobacterial cells but also to better understanding of the mechanism of action of pyrazinamide, a first-line anti-tuberculosis drug. PNPase is found to be a molecular target for an active metabolite of pyrazinamide. The results presented here provide innovative methodologies, helpful in research studies on protein-protein and protein-nucleic acids interactions, that are not only exclusive to mycobacterial research, but may be applied to other organisms. The work carried on Prim-PolC may result in future discoveries of therapies that will rely on inhibition of the activities of AEP enzymes in mycobacteria as novel antibacterial therapies.

#### **Financial support:**

1. Research grant from the National Science Center, Republic of Poland, SONATA 10, 2015/19/D/NZ1/02842 [The role of core RNA decay machinery in regulation of metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*]; **Role in the project: *principle investigator***, project completed
2. Research grant from The Polish Ministry of Science and Higher Education (currently The Polish Ministry of Education and Science), Mobility Plus III, 1073/MOB/2013/0 [The role of bacterial AEP type primases and DNA ligases in the DNA repair in *Mycobacterium*]; **Role in the project: *principle investigator***, project completed

### 4.3.5 Summary

All the above-mentioned publications in Part 1 and in Part 2, being a part of the publication series given to be evaluated, present experiments that had some significant impact on our understanding of individual roles of several protein-protein or protein-nucleic acids complexes in the physiology and bacterial metabolism. Presented here manuscripts have an added value of describing novel methodologies for identification and evaluation of proteins as future molecular targets for anti-tuberculosis therapies. This will aid our understanding of the nature and sources of mechanisms partaking in adaptation of bacteria to changing growth environment and, in the long run, the research will help to plan novel therapeutic avenues, or to explain the mechanisms of action of currently used anti-tuberculosis drugs, to limit the tuberculosis burden in millions of people worldwide.

#### Bibliography:

1. WHO. (2023) WHO global tuberculosis report. World Health Organization.
2. Gideon, H.P. and Flynn, J.L. (2011) Latent tuberculosis: what the host "sees"? Immunologic research, 50, 202-212.
3. Augustynowicz-Kopec, E., Demkow, U., Grzelewska-Rzymowska, I., Korzeniewska-Koseła, M., Langfort, R., Michalowska-Mitczuk, D., Rowinska-Zakrzewska, E., Zielonka, T.M., Ziolkowski, J. and Zwolska, Z. (2013) [Guidelines of Polish Respiratory Society concerning diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis in adults and in child]. *Pneumonologia i alergologia polska*, 81, 325-379.
4. (2023). *Biuletyn Informacji Publicznej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie*.
5. Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393, 537-544.
6. DeJesus, M.A., Gerrick, E.R., Xu, W., Park, S.W., Long, I.E., Boutte, C.C., Rubin, E.J., Schnappinger, D., Ehrt, S., Fortune, S.M. et al. (2017) Comprehensive Essentiality Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Genome via Saturating Transposon Mutagenesis. *mBio*,
7. Griffin, J.E., Gawronski, J.D., DeJesus, M.A., Ioerger, T.R., Akerley, B.J. and Sasseti, C.M. (2011) High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLOS pathogens*, 7, e1002251.
8. North, E.J., Jackson, M. and Lee, R.E. (2014) New approaches to target the mycolic acid biosynthesis pathway for the development of tuberculosis therapeutics. *Current pharmaceutical design*, 20, 4357-4378.
9. Dziadek, J., Madiraju, M.V., Rutherford, S.A., Atkinson, M.A. and Rajagopalan, M. (2002) Physiological consequences associated with overproduction of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ in mycobacterial hosts. *Microbiology*, 148, 961-971.
10. Dziadek, J., Rutherford, S.A., Madiraju, M.V., Atkinson, M.A. and Rajagopalan, M. (2003) Conditional expression of *Mycobacterium smegmatis* ftsZ, an essential cell division gene. *Microbiology*, 149, 1593-1603.
11. Adams, D.W. and Errington, J. (2009) Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly Of the Z ring. *Nature reviews. Microbiology*, 7, 642-653.

12. Hett, E.C. and Rubin, E.J. (2008) Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 72, 126-156, table of contents.
13. Plocinski, P., Ziolkiewicz, M., Kiran, M., Vadrevu, S.I., Nguyen, H.B., Hugonnet, J., Veckerle, C., Arthur, M., Dziadek, J., Cross, T.A. et al. (2011) Characterization Of CrgA, a new partner of the *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycan polymerization complexes. *Journal of bacteriology*, 193, 3246-3256.
14. Singh, V., Dhar, N., Pato, J., Kolly, G.S., Kordulakova, J., Forbak, M., Evans, J.C., Szekely, R., Rybniker, J., Palcekova, Z. et al. (2017) Identification of aminopyrimidine-sulfonamides as potent modulators of Wag31-mediated cell elongation in mycobacteria. *Molecular microbiology*, 103, 13-25.
15. Galagan, J.E., Minch, K., Peterson, M., Lyubetskaya, A., Azizi, E., Sweet, L., Gomes, A., Rustad, T., Dolganov, G., Glotova, I. et al. (2013) The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia. *Nature*, 499, 178-183.
16. Njire, M., Wang, N., Wang, B., Tan, Y., cai, X., Liu, Y., Mugweru, J., Guo, J., Hameed, H.M.A., Tan, S. et al. (2017) Pyrazinoic Acid Inhibits a Bifunctional Enzyme in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61.

### **4.3.7 Presentation of remaining scientific or artistic achievements**

#### ***Before obtaining the PhD degree***

My master's thesis entitled: "The influence of prolactin on the replication of *Toxoplasma gondii in vitro*" was conducted under careful supervision of Prof. dr hab. Henryka Długońska, in the Department of Immunoparasitology, part of the Department of Immunology and Infectious Biology at the University of Łódź. As a part of my master's thesis project, I was involved in the investigation of the roles of human steroid and non-steroid hormones at the rate and dynamics of replication of the human parasite *Toxoplasma gondii* in the *in vitro* culturing conditions. I contributed to the work on the influence of human sex hormones as modulators of the immunological response to infection with *T. gondii* [Płociński et al. 2007; Dzitko et al. 2010]. During my studies, I applied for and was selected to participate as an IAESTE scholar, which allowed me practicing for two months at the Robert Koch Institute, Wernigerode, Germany, at the National Reference Centre for *Salmonella* and other Enteric Pathogens, where I was involved in epidemiological studies on human intestinal pathogens. Work conducted during my master's project resulted in one manuscript describing experimental work and in one review article.

### Manuscripts:

1. **Płociński P**, Dzitko , Długońska H. Prolaktyna jako modulator odporności przeciw pasożytniczej. [Prolactin as a modulator of antiparasitic immunity]. Wiadomości Parazytologiczne. 2007; 53(4):263-70. Review article in polish.
2. Dzitko K, Gatkowska J, **Płociński P**, Dziadek B, Długońska H. The effect of prolactin (PRL) on the growth of *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. Parasitology Res. 2010 doi: 10.1007/s00436-010-1849-3. Epub 2010 Apr 16.

### Conference attendance:

1. Dzitko K. , **Płociński P.**, Długońska H. Wpływ prolaktyny na wewnątrzkomórkową replikację *Toxoplasma gondii* [The influence of prolactin on the intracellular replication of *Toxoplasma gondii*]. Łódź 2007, 46. Day of Clinical Parasitology, oral presentation.

Legend: person presenting the results

During my PhD project I have changed the research model to *Mycobacterium tuberculosis*. It allowed me to take advantage of the knowledge and experience I have gathered while working with *T. gondii*, which just like *M. tuberculosis*, is mainly an intracellular pathogen, infecting huge number of humans worldwide. Both pathogens, besides the obvious differences, with the first one being a protozoan parasite, and the second being a bacterium, trigger similar pathways of immune response in infected individuals. I started working with *M. tuberculosis* in 2007, when I joined the group of Prof. Malini Rajagopalan working in the Research Centre by the university hospital at the University of Texas, Health Science Center at Tyler, in Tyler, Texas, USA. My PhD thesis was entitled: "Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CrgA as a novel protein involved in septal cell wall synthesis" and it described the role of CrgA protein as a protein involved in cell division and cell cycle in mycobacteria. The experimental work involved generation of an *M. tuberculosis* mutant strain, with deleted CrgA gene, and the resulting strain was characterized phenotypically with determination of cell survival on microbiological media. The analyses included antibiotic sensitivity testing and testing the ability of CrgA mutant to infect THPI cells — a monocyte-macrophage like cell line. With the aid of fluorescent microscopy I was able to document the intracellular localization of CrgA-eGFP inside the mycobacterial cell, which was tethered to the mid-cell division ring.

I was able to show direct interaction between CrgA and FtsZ proteins as well. The experimental work was summarized in a manuscript published in Journal of Bacteriology [Plocinski et al.201 1].

In parallel to working with CrgA, I was also involved in a project describing the intracellular role of the ClpX protease in the regulation of the cell division process and its interaction with FtsZ protein in mycobacteria [Dziedzic et al. 2010]. I partook in studies on the two component signal transduction systems and natural drug resistance mechanisms associated with these pathways. I continued to work on these subjects after finalizing my PhD project. I defended my PhD thesis in October of 2011 at the Institute of Medical Biology of the Polish Academy of Sciences in Lodz, Poland, with honors and I later received the prize from the Scientific Board of the Institute of Medical Biology, for outstanding PhD thesis.

#### **Manuscripts:**

1. Dziedzic R, Kiran M, **Plocinski P**, Ziolkiewicz M, Brzostek A, Moomey M, Vadrevu IS, Dziadek J, Madiraju M, Rajagopalan M. *Mycobacterium tuberculosis* ClpX interacts with FtsZ and interferes with FtsZ assembly. PLoS One. 2010 Jul doi: 10.1371/journal.pone.0011058.
2. **Plocinski P**, Ziolkiewicz M, Kiran M, Vadrevu SI, Nguyen HB, Hugonnet Veckerle C, Arthur M, Dziadek J, Cross TA, Madiraju M, Rajagopalan M. Characterization of CrgA, a new partner of the *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycan polymerization complexes. J Bacteriol. 2011 Jul;193(13):3246-56. doi: 10.1128/JB.00188-11. Epub 2011 Apr 29.

#### **Conference attendance:**

1. Dziedzic R., Kiran M., **Płociński P.**, Madiraju M.V.M., Rajagopalan M. „Regulation of cell division in *Mycobacterium tuberculosis*". MICROBIOT 2008 The 1st Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection, September 2008, Łódź, plakat.
2. Dziedzic R., Kiran M., **Plocinski P.**, Brzostek A., Guzek M., Dziadek J., Madiraju M.V.M., Rajagopalan M., „FtsZ — ClpX interaction and its role in the cell division process in *Mycobacterium tuberculosis*". Texas Tuberculosis Researcher Symposium, February 2009, Houston, USA, plakat,

3. Dziejdzic R., Kiran M., **Plocinski P.**, Ziółkiewicz M., Brzostek A., Moomey M Vadrevu 1., Dziadek J., Madiraju M.V.M., Rajagopalan M. „*Mycobacterium tuberculosis* ClpX interacts with FtsZ and interferes with FtsZ assembly" 110th General meeting of American Society for Microbiology, May 2010, San Diego, USA, plakat,
4. **Plocinski P.**, Kiran M. , Nguyen H., Dziejdzic R., Cross T., Ziółkiewicz M. Brzostek A., Dziadek J. , Madiraju M.V.M., Rajagopalan M. „*Mycobacterium tuberculosis* protein Rv0011c: Interaction with FtsZ and role in cell division" 110th General meeting of American Society for Microbiology, May 2010, San Diego, USA, plakat,

#### Financial support:

1. ZPORR, Action 2.6: Scholarships supporting innovative research of PhD students „Badania nad regulacją podziału komórkowego u *Mycobacterium tuberculosis*" [Studies on the regulation of cell division proces in *Mycobacterium tuberculosis*] University of Lodz, 2009. **Role in the project: principle investigator**, project completed.
2. Projects granted by the NIH (National Institutes of Health): „*Mycobacterium tuberculosis* cell division and proliferation", grant No: ROI-A148417; and „*Mycobacterium tuberculosis* replication and proliferation", grant No: ROIA1084734, University of Texas, Health Science Center. **Role in projects: investigator**, projects completed.

#### **After obtaining the PhD degree.**

Once I have returned from the United States of America I have joined the group led by Prof. dr hab. Andrzej Dziembowski at the Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences in Warsaw. I took part in a large international initiative — SystemTB, where my role was to study protein complexes involved in key processes inside the mycobacterial cells, with the overall aim at finding new molecular targets for innovative therapies to fight tuberculosis [Plocinski et al. 2014; Machova et al. 2014]. I continued to work on protein-protein interactions during both of my post-doctoral stays in British institutes — The National Institute for Medical Research, Medical Research Council, invited by Prof. Douglas Young and while in the Genome Damage and Stability Centre, Medical Research Council, at the University of Sussex, in Prof. Aidan Doherty's

group. In Sussex I was founded by the scholarship from the Polish Ministry of Science and Higher Education — Mobility Plus III. The projects were related to studies on RNA degradation and DNA repair mechanisms in bacteria, but also in higher organisms, including humans. I was responsible for finding the protein interaction partners for the phosphopyruvate carboxykinase in *M. tuberculosis*, the analysis of proteomic data assessing the mycobacterial receptors interacting with the human interleukin 8. My involvement in collaborative initiatives resulted in some influential, highly-ranked research [Machova et al. 2014, Bartlett et al. 2016, Dziadek et al. 2016], including the work published in Nature Communications on the discovery of a mycobacterial DNA mismatch repair system. This work was particularly important as this was the first report ever in Actinobacteriaceae, showing the presence of an operational mismatch repair pathway, which was considered completely absent in this group of bacteria until then [Castaneda-Garcia et al. 2017].

#### **Manuscripts:**

1. Machova I, Snasel J, Zimmermann M, Laubitz D, **Plocinski P**, Oehlmann Singh M, Dostal J, Sauer U, Pichová I. *Mycobacterium tuberculosis* phosphoenolpyruvate carboxykinase is regulated by redox mechanisms and interaction with thioredoxin. J Biol Chem. 2014 May 9;289(19):13066-78. doi:10.1074/jbc.M113.536748. Epub 2014 Mar 21.
2. Bartlett EJ, Brissett NC, **Plocinski P**, Carlberg T, Doherty AJ. Molecular basis fo DNA strand displacement by NHEJ repair polymerases. Nucleic Acids Res. 2016 Mar doi: 10.1093/nar/gkv965. Epub 2015 sep 23.
3. Dziadek B, Brzostek A, Grzybowski M, Fol M, Krupa A, Kryczka J, **Plocinski P**, Kurdowska A, Dziadek J. *Mycobacterium tuberculosis* AtsG (Rv0296c), GlmJ (Rv1018c) and SahH (Rv3248c) Effectors and Contribute to 2016 Feb 2016.
4. Castañeda-García A, Prieto AI, Rodríguez-Beltrán J, Alonso N, Cantillon D, Costas C, Pérez-Lago L, Zegeye ED, Herranz M, **Plociński P**, Tonjum T, García de Viedma D, Paget M, Waddell SJ, Rojas AM, Doherty AJ, Blázquez J. A non-canonical mismatch repair pathway in prokaryotes. Nat Commun. 2017 Jan 27;8:14246. doi: 10.1038/ncomms14246.

### Conference attendance:

1. **Płociński P.**, Laubitz D., Cichocki B., Cysewski D., Malinowska A., Dziembowski A. „High-throughput Analysis of Mycobacterial Interactome”. EMBO conference TUBERCULOSIS 2012, September 2012, Paris, France, poster presentation,
2. **Płociński P.**, Macios M, Niemiec E, Houghton J, Young D, Dziembowski A. „Degradosome as one of the major RNA processing complexes in Mycobacteria”, July 2014 — invited speaker during the 60-th anniversary of the Acid Fast Club, Robert Koch Institute, Berlin, Germany,
3. **Płociński P.** „Degradosome as one of the major RNA processing complexes in Mycobacteria”, 2015 - invited speaker during "Work in Progress" lecture series, School of Life Sciences, University of Sussex, Brighton, The U.K.,
4. **Płociński P.**, Brissett N, Korycka-Machata M, Brzostek A, Dziembowski A, Dziadek J, Doherty A. „Prim2 and LigC are involved in stationary-phase base excision repair in mycobacteria”, 2015, Annual Life Sciences Retreat 2015, Brighton, The U.K., poster presentation, won prize for the best poster in post-doc category.
5. **Płociński P.** „DNA repair systems of tubercle bacilli — new perspective”. September 2016 - invited speaker during the V Congress on Genetics in Lodz, Poland
6. **Płociński P.** „Degradosome as one of the major RNA processing complexes in Mycobacteria”, Mikrobiot Conference 2017, Lodz, Poland, oral presentation,
7. **Brzostek A.**, **Płociński P.**, Dziadek J. „DNA repair in the pathogenicity of tubercle bacilli”. September 2017, 7th International Weigl Conference, Lviv, Ukraine, poster presentation
8. **Płociński P.** „An essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of Mycobacterium tuberculosis”. Global Summit on Microbiology and Virology 2019, Prague, Czech Republic, oral presentation.

Legend: person presenting the results

### Financial support:

1. PPN/BIL/2018/1/00206/U/00004 Exploration of functional complexes in mycobacteria for novel anti-TB drug discovery; bilateral exchange program POLONIUM, together with the Institute of Pharmacology and Structural Biology, in Toulouse, France, **Role in the project: coordinator**

2. Research grant from the National Science Center, Republic of Poland, SONATA 10, 2015/19/D/NZ1/02842 [The role of core RNA decay machinery in regulation of metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*]; **Role in the project: principle investigator**, project completed
3. Research grant from The Polish Ministry of Science and Higher Education (currently The Polish Ministry of Education and Science), Mobility Plus III, 1073/MOB/2013/0 [The role of bacterial AEP type primases and DNA ligases in the DNA repair in *Mycobacterium*]; **Role in the project: principle investigator**, project completed
4. FP7-HEALTH 241587 SystemTB (Systems biology of *Mycobacterium tuberculosis*) FP7 European Commission; **Role in the project: investigator**, project completed.

Amongst my area of research interests I must also list the mycobacterial two component signal transduction systems. Thanks to my skills in the bioinformatics analysis of high-throughput transcriptomic and proteomic data I contributed significantly to the identification of intracellular roles of some of the proteins involved in signal transduction in mycobacteria [Plocinska et al. 2012, Dadura et al. 2017, Antczak et al. 2018, Plocinska et al. 2022].

#### **Manuscripts:**

1. Plocinska R, Purushotham G, Sarva K, Vadrevu IS, Pandeeti EV, Arora N, **Plocinski P**, Madiraju MV, Rajagopalan M. Septal localization of the *Mycobacterium tuberculosis* MtrB sensor kinase promotes MtrA regulon expression. J Biol Chem. 2012 Jul 6;287(28):23887-99. doi: 10.1074/jbc.M112.346544. Epub 2012 May 20.
2. Antczak M, Płocińska R, **Płociński P**, Rumijowska-Galewicz A, Żaczek A, Strapagiel D, Dziadek J. The NnaR orphan response regulator is essential for the utilization of nitrate and nitrite as sole nitrogen sources in mycobacteria. Sci Rep. 2018 Dec 3;8(1):17552. doi: 10.1038/s41598-018-35844-z.
3. Dadura K, Płocińska R, Rumijowska-Galewicz A, **Płociński P**, Żaczek A, Dziadek B, Zaborowski A, Dziadek J. PdtA Deficiency Affects Resistance of Mycobacteria to Ribosome Targeting Antibiotics. Front Microbiol. 2017 Nov 3;8:2145. doi: 10.3389/fmicb.2017.02145. eCollection 2017.
4. Płocińska R, Wasik K, **Płociński P**, Lechowicz E, Antczak M, Błaszczuk E, Dziadek B, Słomka M, Rumijowska-Galewicz A, Dziadek J. The Orphan Response Regulator

Rv3143 Modulates the Activity of the NADH Dehydrogenase Complex (Nuo) in *Mycobacterium tuberculosis* via Protein-Protein Interactions. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Jun 28;12:909507. doi: 10.3389/fcimb.2022.909507.

#### Conference attendance:

1. Rajagopalan M., Plocinska R., Gorla P., Sarva K., Vadrevu 1., Pandeeti E., Arora N., Plocinski P., Madiraju M. „*Mycobacterium tuberculosis* MtrB sensor kinase septal localization and the expression of MtrA response regulator targets". EMBO conference TUBERCULOSIS 2012, September 2012, Paris, France, poster presentation.
2. Antczak M., Ptocińska R., Ptocifiski P., Rumijowska-Galewicz A., Dziadek J. [The role of regulatory proteins MSMEG 5784 and MSMEG\_0432 in nitrogen metabolism in *Mycobacterium smegmatis*] The III Polish Conference of PhD Students of Life Sciences BioOpen. 11-12.05.2017, Lodz, Poland, poster presentation.
3. Antczak M., Ptocińska R., Ptocifiski P., Dadura K., Dziadek J. [The role of MSMEG\_0432 regulatory protein of *Mycobacterium smegmatis* in nitrogen metabolism]. 4th Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection MIKROBIOT 2017. 19-21.09.2017, Lodz, Poland, poster presentation.
4. Dadura K., Rumijowska-Galewicz A., Lewandowska K., Zaczek A., Ptocifiska R., Ptocifiski P., Antczak M., Dziadek J. [PdtA deficiency affects resistance of mycobacteria to ribosome targeting antibiotics]. 4th Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection MIKROBIOT 2017, 19-21.09.2017, Lodz, Poland, poster presentation.

Currently, I continue research on DNA repair and RNA degradation as part of the SONATA (completed), Opus (2020-2024) and SONATA BIS (2020-2025) projects, of which I am the Principal Investigator. The processes of nucleic acids metabolism are extremely important for the survival of every living cell [Płocińska et al. 2017]. In 2020, I established cooperation with Prof. Nicolai van Oers from the University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, with whom we summarized the information available in the scientific literature on the regulation of mycobacterial transcription by small non-coding RNAs [Coskun et al. 2021]. In the same year, I started cooperation with the group of Prof. dr hab. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska on the study of the effect of

histone-like bacterial DNA-binding proteins in mycobacteria, in which I performed transcriptomic analyzes of strains devoid of the tested proteins under normoxic and hypoxic conditions [Kołodziej et al. 2021]. Currently, maintaining cooperation with the group of prof. Doherty, with whom I did a long-term postdoctoral fellowship, continues to work on DNA damage repair mechanisms in mycobacteria. Further research on the PrimPolC enzyme resulted in publications [Brissett et al. 2020], for which I prepared some of the genetic constructs and tested the activity of mutated variants of the PrimPolC protein. Together with Dr. Anna Brzostek, I was the leader in research on describing the RecA-dependent and RecA-independent response to inducing DNA damage in mycobacteria described in the paper from 2021 [Brzostek, Plocinski et al. 2021]. Basic research on DNA repair processes provides information on evolutionarily conserved mechanisms common to bacterial cells and higher organisms. These processes are related, for example, to the mechanisms of carcinogenesis and aging, important problems of biology and medicine on a national and global scale.

#### **Manuscripts:**

1. Płocińska R, Korycka-Machała M, **Płociński P**, Dziadek J. Mycobacterial DNA Replication as a Target for Antituberculosis Drug Discovery. *Curr Top Med Chem*. 2017 Jun 16;17(19):2129-2142. doi: 10.2174/1568026617666170130114342. Review article.
2. Coskun FS, **Płociński P**, van Oers NSC. Small RNAs Asserting Big Roles in Mycobacteria. *Noncoding RNA*. 2021 Oct 29;7(4):69. doi: 10.3390/ncrna7040069. Review article.
3. Kołodziej M, Łebkowski T\*, **Płociński P\***, Hołówka J, Paściak M, Wojtaś B, Bury K, Konieczny I, Dziadek J, Zakrzewska-Czerwińska J. Lsr2 and Its Novel Parologue Mediate the Adjustment of *Mycobacterium smegmatis* to Unfavorable Environmental Conditions. *mSphere*. 2021 May 12;6(3):e00290-21. doi: 10.1128/mSphere.00290-21. [\* - authors contributed equally]
4. Brissett NC, Zabradny K, **Płociński P**, Bianchi J, Korycka-Machała M, Brzostek A, Dziadek J, Doherty AJ. Molecular basis for DNA repair synthesis on short gaps by mycobacterial Primase-Polymerase C. *Nat Commun*. 2020 Aug 21;11(1):4196. doi: 10.1038/s41467-020-18012-8.

5. Brzostek A\*, **Płociński P\***, Minias A, Ciszewska A, Gąsior F, Pawełczyk J, Dziadek B, Słomka M, Dziadek J. Dissecting the RecA-(In)dependent Response to Mitomycin C in *Mycobacterium tuberculosis* Using Transcriptional Profiling and Proteomics Analyses. *Cells*. 2021 May 11;10(5):1168. doi: 10.3390/cells10051168. [\* - authors contributed equally]

6. **Płociński P**, Dziadek J. New players of DNA excision repair in mycobacteria. Annual Report of the Polish Academy of Sciences. 2018: 62-64. ISSN 1640-3754. Popular science article.

#### Conference attendance:

1. 22-23 July 2023, scientific conference Gordon Research Seminars Tuberculosis Drug Discovery and Development, Barcelona, Spain, "Towards deciphering the role of SRAP Proteins Associated with DNA Damage Repair in *Mycobacterium*". Gąsior F., **Płociński P.**, Dziadek J., Brzostek A. - poster presentation.

2. 22-23 July 2023 scientific conference Gordon Research Seminars Tuberculosis Drug Discovery and Development, Barcelona, Spain, "Mycobacterial RNA decay machinery as a target for the development of future antimicrobials". Lavrynychuk Y., Skibiński J, Włodarczyk M., Dziadek J., Chmiela M., **Płociński P.** - poster presentation.

3. September 15-17, 2022. XXIX Congress of the Polish Society of Microbiologists, Warsaw, Poland, "Assessment of the efficiency of the trans-translation process in *Mycobacterium tuberculosis* in the light of the anti-mycobacterial activity of pyrazinamide". Lavrynychuk Y. **Płociński P**, Chmiela M. - poster presentation.

4. September 15-17, 2022. XXIX Congress of the Polish Society of Microbiologists, Warsaw, Poland, "Study of the activity of bacterial helicase from the DEAD family, in the context of the search for new antimicrobial drugs to combat drug-resistant *Helicobacter pylori* infections." Skibiński J. **Płociński P**, Rudnicka K, Zarzecka U, Chmiela M. - oral presentation.

5. June 27-30, 2022. VI Polish Genetics Congress, Krakow, Poland, "Functional analysis of a potential DNA repair protein Msmeg\_1891 in *Mycobacterium smegmatis*". Gąsior F., Płociński P., Dziadek J., Brzostek A. - oral presentation.
6. June 28-29, 2021, ESM 41st Annual Congress (Virtual), "Determination of the Msmeg\_1891 role in response to DNA damage in *M. smegmatis*". Gąsior F., Płociński P., Dziadek J., Brzostek A. - poster presentation.
7. 2 December 2019, Macro-faculties in micro-biology, Warsaw, Poland. "Involvement of the Msmeg\_1891 protein in the DNA damage response in *M. smegmatis*". Gąsior F., Płociński P., Dziadek J., Brzostek A. - poster presentation.

#### Financial support:

1. Research grant from the National Science Center, Republic of Poland, Opus 17, 2019/33/B/NZ1/02770 [Deciphering the role of putative protein factors involved in the mycobacterial DNA strand break repairs] **Role in the project: *principle investigator***, project ongoing
2. Research grant from the National Science Center, Republic of Poland, SONATA BIS, 2019/34/E/NZ1/00338 [Structural insights into the involvement of the RNA degradosome in trans-translation in the light of the antimicrobial activity of pyrazinamide – perspectives for anti(myco)bacterial drug discovery.] **Role in the project: *principle investigator***, project ongoing
3. Research grant from the National Science Center, Republic of Poland, SONATA 10, 2015/19/D/NZ1/02842 [The role of core RNA decay machinery in regulation of metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*]; **Role in the project: *principle investigator***, project completed

Thanks to the skills I have acquired in the area of bioinformatics analysis of transcriptomic and proteomic data, I often engage in scientific cooperation in research going beyond my main scientific interests, which is the metabolism of tuberculosis nucleic acids. As part of internal cooperation at the Institute of Medical Biology of the Polish Academy of Sciences in Łódź, I conducted, among others, analysis of transcriptomic data from *Mycobacterium tuberculosis* cultured in the presence of cholesterol [Pawełczyk et al. 2021], inhabiting human macrophages [Kawka et al. 2021] or mycobacteria treated with

innovative growth inhibitors [Korycka-Machała et al. 2022]. For the group of Prof. dr hab. Jerzy Długoński from the University of Lodz, I conducted proteomic analyzes for the species identification of fungi producing an enzyme of potentially great importance for industry [Góralczyk et al. 2020] and in working with the group of dr hab. Joanna Boncela, prof. IBM PAN, I identified in the mass spectra of the IBM PAN a variant of the human Neuromedin U peptide responsible for an interesting phenotypic effect in the context of carcinogenesis and tumor metastasis [Przygodzka et al. 2021].

### **Manuscripts:**

1. Pawełczyk J, Brzostek A, Minias A, **Płociński P**, Rumijowska-Galewicz A, Strapagiel D, Zakrzewska-Czerwińska J, Dziadek J. Cholesterol-dependent transcriptome remodeling reveals new insight into the contribution of cholesterol to *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Sci Rep.* 2021 Jun 11;11(1):12396. doi: 10.1038/s41598-021-91812-0.
2. Kawka M, Brzostek A, Dzitko K, Kryczka J, Bednarek R, Płocińska R, **Płociński P**, Strapagiel D, Gatkowska J, Dziadek J, Dziadek B. *Mycobacterium tuberculosis* Binds Human Serum Amyloid A, and the Interaction Modulates the Colonization of Human Macrophages and the Transcriptional Response of the Pathogen. *Cells.* 2021 May 20;10(5):1264. doi: 10.3390/cells10051264.
3. Korycka-Machała M, Kawka M, Lach J, Płocińska R, Bekier A, Dziadek B, Brzostek A, **Płociński P**, Strapagiel D, Szczesio M, Gobis K, Dziadek J. 2,4-Disubstituted pyridine derivatives are effective against intracellular and biofilm-forming tubercle bacilli. *Front Pharmacol.* 2022 Nov 10;13:1004632. doi: 10.3389/fphar.2022.1004632.
4. Góralczyk-Bińkowska A, Jasińska A, Długoński A, **Płociński P**, Długoński J. Correction: Laccase activity of the ascomycete fungus *Nectriella pironii* and innovative strategies for its production on leaf litter of an urban park. *PLoS One.* 2020 May 14;15(5):e0233553. doi: 10.1371/journal.pone.0233553.
5. Przygodzka P, Sochacka E, Soboska K, Pacholczyk M, Papiewska-Pająk I, Przygodzki T, **Płociński P**, Ballet S, De Prins A, Boncela J. Neuromedin U induces an invasive phenotype in CRC cells expressing the NMUR2 receptor. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021 Sep 7;40(1):283. doi: 10.1186/s13046-021-02073-8.

Since January 2020, I have been involved in a project implemented at the Department of Immunology and Infectious Biology of the Faculty of Biology and Environmental Protection of the University of Lodz, in the research group of Prof. dr hab. Magdalena Mikolajczyk-Chmiela. The project entitled "Multifunctional biologically active composites for use in regenerative medicine of the skeletal system" was awarded as part of the TEAM-NET competition of the Polish Science Foundation financed by the European Union. Through a competition, I assumed the role of the Young Research Team Leader in this project and took up the challenge of coordinating the work of the project team of the University of Lodz in substantive aspects, with the support of a member of the project steering committee - Dr. Karolina Rudnicka. The project is implemented on the basis of multi-center cooperation, in a scientific consortium led by the team of Prof. dr hab. Eng. Andrzej Trochimczuk from the Wrocław University of Technology, together with the group of Prof. dr hab. Eng. Agnieszka Sobczak-Kupiec from the Cracow University of Technology and the group of Dr. Eng. Monika Biernat from the Institute of Ceramics and Building Materials of the Łukasiewicz Research Network based in Warsaw. Thanks to our research group obtaining funding for an additional research task in the project, the research is continued until the end of September this year. So far, the cooperation of the entire consortium has resulted in at least 28 scientific publications and 11 patent applications, and the vast majority of these works have been carried out in cooperation with at least 2 out of 4 consortium partners. The research concerned the development of innovative polymer-ceramic-based biomaterials for use in regenerative medicine for the treatment of bone tissue defects. My involvement in research on biomaterials was developed through scientific cooperation of our team with the group of Prof. dr hab. Sylwia Rodziewicz-Motowidło from the University of Gdańsk and the group of dr hab. Eng. Katarzyna Nawrotek from the Lodz University of Technology. The research mainly concerned cytocompatibility, biocompatibility and bioefficiency analyzes as normative tests based on the ISO 19993 standard system and included *in vitro* and *in vivo* tests on house mouse and brown rat models. Involvement in the TEAM-NET project motivated me to gain additional qualifications, such as the right to conduct experiments on animals or to undergo training in conducting clinical trials, which is necessary for the future commercialization of the solutions currently being developed in our research.

Besides working on mycobacterial models, I have recently gotten involved in the project entitled "Multifunctional composites biologically active for applications in

regenerative medicine of bone system”. The project is carried out within the TEAM NET program supported by the Foundation for Polish Science. I am using my knowledge and experience in protein purification, proteomics and transcriptomics analyses to aid the engineers in producing highly biocompatible and safe scaffolds for treatment of bone injury. The research involves production and incorporation of various recombinant growth factors, testing the cytotoxicity and biosafety of various polymer based materials that can support bone regeneration.

### **Manuscripts:**

1. Urbaniak MM, Gazińska M, Rudnicka K, **Płociński P**, Nowak M, Chmiela M. *In Vitro and In Vivo* Biocompatibility of Natural and Synthetic *Pseudomonas aeruginosa* Pyomelanin for Potential Biomedical Applications. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 25;24(9):7846. doi: 10.3390/ijms24097846.
2. Biernat M, Szwed-Georgiou A, Rudnicka K, **Płociński P**, Pagacz J, Tymowicz-Grzyb P, Woźniak A, Włodarczyk M, Urbaniak MM, Krupa A, Rusek-Wala P, Karska N, Rodziewicz-Motowidło S. Dual Modification of Porous Ca-P/PLA Composites with APTES and Alendronate Improves Their Mechanical Strength and Cytobiocompatibility towards Human Osteoblasts. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 18;23(22):14315. doi: 10.3390/ijms232214315.
3. Kasprzak M, Szabłowska A, Kurzyk A, Tymowicz-Grzyb P, Najmrodzki A, Woźniak A, Antosik A, Pagacz J, Szturner P, Plichta A, Wieciński P, Rusek-Wala P, Krupa A, **Płociński P**, Rudnicka K, Biernat M. Effects of Sterilization and Hydrolytic Degradation on the Structure, Morphology and Compressive Strength of Polylactide-Hydroxyapatite Composites. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 9;23(18):10454. doi: 10.3390/ijms231810454.
4. Korbut A, Włodarczyk M, Rudnicka K, Szwed A, **Płociński P**, Biernat M, Tymowicz-Grzyb P, Michalska M, Karska N, Rodziewicz-Motowidło S, Szustakiewicz K. Three Component Composite Scaffolds Based on PCL, Hydroxyapatite, and L-Lysine Obtained in TIPS-SL: Bioactive Material for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 18;22(24):13589. doi: 10.3390/ijms222413589.

5. Piszko P, Włodarczyk M, Zielińska S, Gazińska M, **Płociński P**, Rudnicka K, Szwed A, Krupa A, Grzymajło M, Sobczak-Kupiec A, Słota D, Kobielarz M, Wojtków M, Szustakiewicz K. PGS/HAp Microporous Composite Scaffold Obtained in the TIPS- TCL-SL Method: An Innovation for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 10;22(16):8587. doi: 10.3390/ijms22168587.
6. Szustakiewicz K, Włodarczyk M, Gazińska M, Rudnicka K, **Płociński P**, Szymczyk-Ziółkowska P, Ziółkowski G, Biernat M, Sieja K, Grzymajło M, Józwiak P, Michlewska S, Trochimczuk AW. The Effect of Pore Size Distribution and l-Lysine Modified Apatite Whiskers (HAP) on Osteoblasts Response in PLLA/HAP Foam Scaffolds Obtained in the Thermally Induced Phase Separation Process. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 30;22(7):3607. doi: 10.3390/ijms22073607.
7. Nawrotek K, Rudnicka K, Gatkowska J, Michlewska S, Pearson BL, **Płociński P**, Wieczorek M. Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 3-loaded microspheres penetrate neurons in vitro causing active demethylation and neurite outgrowth. *J Tissue Eng Regen Med.* 2021 May;15(5):463-474. doi: 10.1002/term.3185.
8. Gazińska M, Krokos A, Kobielarz M, Włodarczyk M, Skibińska P, Stępak B, Antończak A, Morawiak M, **Płociński P**, Rudnicka K. Influence of Hydroxyapatite Surface Functionalization on Thermal and Biological Properties of Poly(l-Lactide)- and Poly(l-Lactide-co-Glycolide)-Based Composites. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 13;21(18):6711. doi: 10.3390/ijms21186711.

### **Conference attendance**

1. 19-24 March 2023 Gordon Research Conferences Cartilage Biology and Pathology, Lucca, Italy, "Comprehensive assessment of biocompatibility and bioactivity of piomelanin-based composites supporting bone regeneration". Urbaniak M. M., Szwed-Georgiou A., Krupa A., Włodarczyk M., Nowak M., Gazińska M., Biernat M., Szustakiewicz K., **Płociński P.**, Rudnicka K. - plakat presentation. (presenting author)
2. May 27-28, 2022. National conference IMPLANTS 2022 - Engineering, Medicine and Science in pursuit of the perfect implant Gdańsk, Poland, Gdańsk University of

Technology, "Biocompatibility of *Pseudomonas aeruginosa* pyomelanins - natural polymers with regenerative potential". Urbaniak M. M., Rudnicka K., **Płociński P.**, Nowak M., Gazińska M., Cybulski M., Mikołajczyk-Chmiela M. - poster presentation.

3. May 27-28, 2022. National conference IMPLANTS 2022 - Engineering, Medicine and Science in pursuit of the perfect implant Gdańsk, Poland, Gdańsk University of Technology, "Biological effect of cholesterol modification of PLA-HAp composites on the growth of human osteoblasts". Rusek-Wala P., Biernat M, Woźniak M, Włodarczyk M, **Płociński P**, Krupa A. - poster presentation.

4. 14-17 October 2021, 30th Anniversary Conference of the Polish Society for Biomaterials "Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine", Ryto, Poland "Physicochemical and *in vitro* biological properties of porous PLLA/HAp-Zn composites modified with sodium alendronate" Biernat M., Kasprzak M., Szabłowska A., Woźniak A., Najmrodzki A., Tymowicz-Grzyb P., Antosik A., Rusek-Wala P., Krupa A., **Płociński P.** - poster presentation.

5. February 12-15, 2020, 1st Open Meeting of the EuroMicroPH, CA18113 – Understanding and exploiting the impacts of low pH on microorganisms, COST European Cooperation in Science & Technology, Instituto Superior Técnico, Lisbon, Portugal, "Physicochemical and biological characterization of pyomelanin isolated from *P. aeruginosa* in regard of antimicrobial and proregenerative activity", Urbaniak M., Gonciarz W., Rudnicka K., **Płociński P.**, Chmiela M. – poster presentation.

### **Financial support**

1. Additional research task as part of the extension of the TEAM-NET project "Comprehensive assessment of biocompatibility and bioactivity of pyomelanin supporting bone regeneration and vascularization processes", financed by the Foundation for Polish Science, implemented at the University of Lodz until September 30, 2023 as an applicant for funding and **Young Leader of the Research Team.**

## **Scientific plans**

My current scientific research focuses mainly on the analysis of the cellular functions of the RNA degradosome elements of the pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* and saprophytic *Mycobacterium smegmatis*. The analysis of similarities and differences in the role of individual proteins of the RNA degradosome complex in these bacteria will provide basic knowledge for understanding the mechanisms of post-transcriptional regulation of gene expression in bacteria. Currently, together with PhD students, I am attempting to crystallize the PNP protein, degradosome component, in order to solve its structure, for a more complete understanding of the mechanism of action of pyrazine acid (the active metabolite of pyrazinamide) on *Mycobacterium tuberculosis*. In the near future, I also intend to optimize the colorimetric assay for the activity of the PNP protein, using its ability to hydrolyse the alarmone (p)ppGpp *in vitro*, or to design an alternative assay to track PNP activity.

The colorimetric assay will enable high-throughput screening for inhibitors of this essential component of the mycobacterial RNA degradosome. Additional experiments using already prepared strains of *M. tuberculosis* mutants with regulated production of RNA degradosome components will determine the role of these enzymes for the proper adaptation of bacteria to the conditions of oxidative stress. At the same time, I plan to continue research on DNA damage repair mechanisms in mycobacteria in the context of the analysis of protein complexes involved in these processes.

## **5. Information on demonstrating significant scientific or artistic activity carried out in more than one university, scientific or cultural institution, in particular a foreign one**

I consider my studies to be universal and interdisciplinary. I have spent significant amount of time in foreign research institutions and attended national and international conferences, where I am trying to disseminate my research results and promote Polish research. I am also actively looking for opportunities to collaborate in international initiatives that focus on the universal problems of health care systems, in the field of microbiology and research on the mechanisms of tissue regeneration.

My previous employment included employment contracts at the University of Texas at Tyler, USA (2007-2010), Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences in Warsaw (2011-2016), National Center for Medical Research in London, UK (2014), Institute of Medical Biology Polish Academy of Sciences in Łódź (2016-present) and the University of Łódź, Poland (2020-present). Under each of the employment contracts, I conducted scientific research, which significantly contributed to the development of knowledge in the areas of research, as evidenced by scientific publications in renowned scientific journals from the JCR list, with significant Impact Factors. I am constantly developing scientific cooperation established during foreign internships or during involvement in international cooperation programs in which I participated.

## **5.1. Stays in foreign scientific units**

### ***Before obtaining a doctoral degree***

September 2007 - December 2010 (40 months) - internship at The University of Texas, Health Science Center at Tyler, under the supervision of prof. Malini Rajagopalan, Tyler, Texas, USA.

July and August 2006 (2 months) - internship in a scientific laboratory as part of the IAESTE exchange program, at the National Reference Center for Research on *Salmonella* and other Enterobacteria, Robert Koch Institute, in a group led by prof. Helmut Tschaepe, Wernigerode, Germany

### ***After obtaining a doctoral degree***

July 2014 - June 2016 (24 months) - postdoctoral fellowship at the Medical Research Council Genome Damage and Stability Centre, under the supervision of prof. Aidan Doherty, University of Sussex, Brighton, U.K., delegated from the Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences as part of an pay-free leave to implement the "Mobility Plus III" project

January 2014 - June 2014 (6 months) - postdoctoral fellowship at the Medical Research Council National Institute for Medical Research, transformed into the Francis Crick

Institute, in the group of prof. Douglas Young, London, United Kingdom, for the implementation of scientific cooperation under the SystemTB project (System Biology of *Mycobacterium tuberculosis*)

## **5.2 Scientific cooperation supported by joint publications or applications for research funding at the national or international level**

1. Institute of Pharmacology and Structural Biology, University of Toulouse, Toulouse, France, dr hab. Hedia Marrakchi, joint involvement in the implementation of the SystemTB and POLONIUM projects.

2. Francis Crick Institute, London, Great Britain, prof. Douglas Young (&), joint involvement in the implementation of the SystemTB project.

3. London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK, Dr. Joanna Houghton, Dr. Teresa Cortes, joint involvement in the SystemTB project.

4. University of Sussex, Brighton, UK, prof. Aidan Doherty, Dr. Nigel Brissett, supervisors of the postdoctoral fellowship within the Mobility Plus III project, further cooperation maintained in the field of research on DNA damage repair pathways.

5. Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic, Dr. Iva Pichova, joint involvement in the SystemTB project.

6. Spanish National Research Council, National Center of Biotechnology in Madrid, Madrid, Spain, prof. Jesús Blázquez, dr Alfredo Castañeda-García, cooperation within the Mobility Plus III project.

7. Center for Health Sciences, University of Texas at Tyler, Tyler, Texas, USA, prof. Malini Rajagopalan (&), prof. Murty Madiraju (&), prof. Anna Kurdowska, cooperation established during her employment at the University of Texas at Tyler.

8. European Molecular Biology Laboratory in Hamburg, Germany, prof. Matthias Wilmanns, joint involvement in the implementation of the SystemTB project.

9. University of Eastern Piedmont, Piedmont, Italy, Dr. Menico Rizzi, Dr. Franca Rossi, joint involvement in the implementation of the SystemTB project.

10. Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences and the International Institute of Molecular and Cell Biology, Warsaw, prof. Andrzej Dziembowski, joint involvement in the implementation of the SystemTB project and during further employment at the Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences in Warsaw.

11. Department of Molecular Microbiology, University of Wrocław, Wrocław, prof. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska, Marta Kołodziej, MA, cooperation in the project on the analysis of the function of the Lsr-2 protein in Mycobacterium.

12. Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela, dr hab. Katarzyna Dzitko (prof. UŁ), dr hab. Bożena Dziadek (prof. UŁ), dr hab. Agnieszka Krupa, dr hab. Justyna Gatkowska (prof. UŁ) Karolina Rudnicka, PhD, Aleksandra Góralczyk-Bińkowska, MA, cooperation during employment at the University of Lodz supported by joint scientific publications.

13. Biobank Laboratory, Department of Molecular Biophysics, Institute of Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Dr. Dominik Strapagiel (prof. UŁ), cooperation during employment at the University of Lodz supported by joint scientific publications

14: Wrocław University of Technology, Wrocław, Poland, Prof. dr hab. Eng. Andrzej Trochimczuk, dr hab. Eng. Konrad Szustakiewicz (Prof. WUST), Dr. Eng. Małgorzata Gazińska, cooperation in the implementation of the TEAM-NET project

15: Cracow University of Technology, Cracow, Poland, Prof. dr hab. Eng. Agnieszka Sobczak-Kupiec, cooperation in the implementation of the TEAM-NET project

16: Institute of Ceramics and Building Materials Łukasiewicz Research Network, Warsaw, Poland, dr inż. Monika Biernat, cooperation in the TEAM-NET project

17: University of Gdańsk, Gdańsk, Poland, Prof. dr hab. Sylwia Rodziewicz-Motowidło

18: Lodz University of Technology, Lodz, Poland, dr hab. Eng. Katarzyna Nawrotek (Professor of TUL)

*Legend: (&)-currently retired employees*

### **Membership in international and national organizations and scientific societies**

1. Acid Fast Club - scientific society for research on tuberculosis, participation in meetings of the scientific society in 2014

2. American Society for Microbiology - as an active member of the society in 2009-2010

## **6. Information on teaching, organizational and science or art achievements.**

In my scientific work, I take research positions, but I try to actively participate in conducting classes with students. In 2011 and 2012, I helped prof. Dziembowski in conducting a series of practical classes in proteomics for students of the Faculty of Biology at the University of Warsaw.

In 2015-2016, I participated, under the guidance of prof. Aidan Doherty, in teaching biological computation to students at the University of Sussex, Brighton, UK.

### **6.1.1 Scientific supervision of students**

Wołek K, 2012, Bachelor's thesis (experimental work), 6 months "Study of interactions between proteins involved in DNA repair in *Mycobacterium*", University of Warsaw, under the supervision of prof. Andrzej Dziembowski,

Beaney C, 2015, BA thesis (experimental), 6 months "Characterizing Rv1261c and Rv1871c as potential new players in DNA damage response pathways in *Mycobacterium tuberculosis*", University of Sussex, Brighton, UK,

Freestone D, 2016, BA thesis (experimental), 6 months "Characterization of MSMEG\_1282 as a DNA processing enzyme in *Mycobacterium smegmatis*", University of Sussex, Brighton, UK.

### **6.1.2 Scientific supervision of interns**

Urbaniak M, August-September 2018, 4th year student of Microbiology, University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, as part of obligatory student internships at the University of Lodz,

Juszczyk Z, August-September 2018, 4th year student of Microbiology, University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, as part of the obligatory student internship at the University of Lodz,

Atanasova V, June and July 2017, third-year medical student, trainee under the IAESTE scholarship exchange program,

Błaszczak E, 2009 – 2010, care during an internship at the Center for Health Sciences of the University of Texas in Tyler, Texas, USA.

### **6.1.3. Scientific supervision of doctoral students as a scientific supervisor or assistant supervisor**

I am an **assistant supervisor** at the BioMedChem Doctoral School of the University of Lodz and the Institutes of the Polish Academy of Sciences in Lodz:

2019 – present      Filip Gašior, MA, pursuing a doctoral thesis at the Institute of Medical Biology of the Polish Academy of Sciences in Łódź, expected defense date December 2023.

*Thesis supervisor: dr hab. Anna Brzostek, prof. IBM PAN*

2019 – present      Paulina Rusek-Wala, MSc, PhD thesis at the Department of Immunology and Infectious Biology of the University of Lodz, expected defense date December 2023.

*Thesis supervisor: dr hab. Agnieszka Krupa*

2021 – present Yaroslav Lavrynychuk, MSc, working on his doctoral thesis at the Department of Immunology and Infectious Biology of the University of Lodz, mid-term evaluation of the progress of the doctoral thesis scheduled for September 2023.

*Thesis supervisor: Prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela*

#### **6.1.4 Training and courses in the field of didactics**

2020 "Facilitation - how to increase the efficiency of working with a group" workshops conducted by Dr. Beata Master as part of the EDU360 (online) training series,

2020 "Mentoring as a method of knowledge transfer" workshops conducted by Anna Kaczalska as part of EDU360 (online) training series,

2023 training: "Tutor's essay (and not only) as a form of work in any discipline" conducted by Dr. Agnieszka Dziedziczak-Foltyn, University of Lodz, Lodz, Poland,

2023 training entitled: "Academic tutoring - the potential of personalization of education, workshop and tutor tools" conducted by Dr. N. Ratajczyk and Dr. A. Wolańska-Kamińska, University of Lodz, Lodz, Poland,

2023 training: "Tutoring - where to start?" conducted by dr hab. Agnieszka Dziedziczak-Foltyn, University of Lodz, Lodz, Poland,

2023 training entitled: "Developing study skills as part of tutoring" conducted by dr hab. Agnieszka Dziedziczak-Foltyn, University of Lodz, Lodz, Poland,

2023 training: "The use of activating teaching methods in academic education" conducted by Dr. Anna Jasińska, University of Lodz, Lodz, Poland,

2023 training entitled: "Modern tools and applications in teaching" conducted by Dr. Anna Jasińska, University of Lodz, Lodz, Poland.

## **6.2 Science popularizing activity**

### **Lectures outside scientific conferences:**

30.05.2023 Rudnicka K., Płociński P. popular science lecture "Microbiological Creators of Taste, or who really rules in the kitchen" addressed to students of the University of the Third Age in Lodz. Helena Kretz

10.01.2023 Rudnicka K., Płociński P. popular science lecture "What do we know about vaccines against Covid-19?" addressed to students of the Lodz University of the Third Age. Helena Kretz

2.12.2022 Płociński P., Włodarczyk M., Lavrynychuk Y. workshops for students of SP199 in Łódź as part of the Science and Technology Festival organized in this school "What is protein eaten with (in the laboratory)?"

15.04.2021 Rudnicka K., Płociński P. popular science online lecture "What do we know about vaccines against Covid19?" addressed to parents of children associated in the Children's University of the Lodz University of Technology,

06.11.2017 "Study of the participation of RNA degradosome proteins in the regulation of the metabolism of mycobacterium tuberculosis", in the hall of the Institute of Medical Biology of the Polish Academy of Sciences, Łódź

17.12.2013 "RNA decay machinery in mycobacteria" in the auditorium of prof. Gajewski, Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences, Warsaw,

***Before obtaining a doctoral degree***

Participation in the organization of the scientific conference "Bird panic epidemic", devoted to bird flu (16.12.2005), Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz;

Coordination of the activities of the microbiological section operating at the Biologists' Club of the University of Lodz under the project: "Testing the microbiological purity of the air in the building of the animal house of the Faculty of Biology and Environmental Protection" (2006).

**7. Apart from information set out in 1-6 above, the applicant may include other information about his/her professional career, which he/she deems important.**

#### **7.1 Specialized Courses and Functions**

2023 - certified stationary training for researchers and research teams "Conducting clinical trials in accordance with the principles of Good Clinical Practice" Brilliance, Clinical Research in Krakow, Poland

2019 course of protein crystallography "Prot XRD" Jerzy Haber Institute of Catalysis and Surface Chemistry, Cracow, Poland, certified course,

2018, participation in training in the safe use of radioactive substances at the Central Laboratory for Radiological Protection in Warsaw, completed with an exam for obtaining the authorization of the Radiological Protection Inspector (IOR-1) conducted by the National Atomic Energy Agency in Warsaw, Poland,

2016, participation in the "Fundamentals of CRISPR-Cas9 gene editing" training, which took place at the Didactic Center of the Medical University of Lodz,

2011, participation in a practical EMBO course in the field of proteomic research using mass spectrometry, certified course,

Since July 2018, I have been the Inspector of Radiological Protection IOR-1 at the Institute of Medical Biology of the Polish Academy of Sciences in Łódź.

14.08.2023 Przemysław Płociński

.....  
(Applicant's signature)