

AUTOREFERAT

Dr Grzegorz Chodaczek

**Laboratorium Mikroskopii Konfokalnej
PORT Polski Ośrodek Rozwoju Technologii**

Wrocław, 20.02.2019

Autoreferat

1. Imię i nazwisko:

Grzegorz Chodaczek

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

2001 – Magister farmacji, zakres: farmacja apteczna

Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu

2007 – Doktor nauk biologicznych, dyscyplina: biologia

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
we Wrocławiu, Polska Akademia Nauk

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Adiuwantowe właściwości kompleksu
laktoferyna – monofosforylowany lipid A”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

11/2005 – 03/2007 Research Associate II, Department of Microbiology &
Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston,
TX, USA

04/2007 – 10/2011 Postdoctoral Fellow, Department of Immunology, University of
Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

11/2011 – 02/2014 Microscopy Core Manager/Instructor, La Jolla Institute for
Allergy & Immunology, La Jolla, CA, USA

03/2014 – obecnie Kierownik Laboratorium Mikroskopii Konfokalnej, PORT
Polski Ośrodek Rozwoju Technologii (poprzednio Wrocławskie
Centrum Badań EIT+), Wrocław

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym (Dz. U. nr. 65, poz. 595 ze zm.):**a) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

NOWE METODY WIZUALIZACJI I OBRAZOWANIA PRZYŻYCIOWEGO
KOMÓREK UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

Sumaryczny IF prac stanowiących cykl wynosi 97,965 (266 punktów MNiSW)

b) Autorzy i tytuły publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Chodaczek G**, Bacsi A, Dharajiya N, Sur S, Hazra TK, Boldogh I. (2009) Ragweed pollen-mediated IgE-independent release of biogenic amines from mast cells via induction of mitochondrial dysfunction. Mol Immunol.; 46(13):2505-14.

IF: 3.202

Autoreferat

Pkt. MNiSW: 24

Udział własny: koncepcja pracy, wykonanie większości badań, opracowanie wyników, współudział w opracowaniu manuskryptu, przygotowanie pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

2. **Chodaczek G**, Papanna V, Zal MA, Zal T. (2012) Body-barrier surveillance by epidermal $\gamma\delta$ TCRs. Nat Immunol.; 13(3):272-82.

IF: 26.199

Pkt. MNiSW: 50

Udział własny: koncepcja pracy, opracowanie technik mikroskopowych i analizy obrazów, wykonanie badań in vivo i in vitro, opracowanie wyników, współudział w opracowaniu manuskryptu, przygotowanie pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

3. **Chodaczek G**, Toporkiewicz M, Zal MA, Zal T. (2018) Epidermal T Cell Dendrites Serve as Conduits for Bidirectional Trafficking of Granular Cargo. Front. Immunol.; 9:1430.

IF₍₂₀₁₇₎: 5.511

Pkt. MNiSW: 35

Udział własny: koncepcja pracy, opracowanie technik mikroskopowych i analizy obrazów, wykonanie większości badań, kierowanie zespołem badawczym, opracowanie większości wyników, współudział w opracowaniu manuskryptu, przygotowanie pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na 65%.

4. Zal T, **Chodaczek G**. (2010) Intravital imaging of anti-tumor immune response and the tumor microenvironment. Semin Immunopathol.; 32(3):305-17.

IF: 5.216

Pkt. MNiSW: 27

Udział własny: koncepcja pracy, przegląd literatury, współudział w opracowaniu techniki przyżyciowego obrazowania płuc i analizy obrazów, współudział w opracowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

5. Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, Herrley E, Rasquinha N, McArdle S, Wu R, Peluso E, Metzger D, Ichinose H, Shaked I, **Chodaczek G**, Biswas SK, Hedrick CC. (2015) Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. Science; 350(6263):985-90.

IF: 34.661

Pkt. MNiSW: 50

Udział własny: praca stworzona została przez multidyscyplinarny i wieloosobowy zespół badawczy i byłem w niej odpowiedzialny za opracowanie technik przyżyciowego obrazowania mikroskopowego płuc i analizy obrazów, wykonywałem i nadzorowałem badania mikroskopowe oraz opracowanie wyników, brałem udział w tworzeniu

Autoreferat

manuskryptu. Mój wkład własny w zakresie całej pracy szacuję na 20% z uwagi na jej wieloaspektowość i złożoność analizy wpływu patrolujących monocytów na metastazy płucne, a w części badań mikroskopowych na 60%.

6. Shaked I, Hanna RN, Shaked H, **Chodaczek G**, Nowyhed HN, Tweet G, Tacke R, Basat AB, Mikulski Z, Togher S, Miller J, Blatchley A, Salek-Ardakani S, Darvas M, Kaikkonen MU, Thomas GD, Lai-Wing-Sun S, Rezk A, Bar-Or A, Glass CK, Bandukwala H, Hedrick CC. (2015) Transcription factor Nr4a1 couples sympathetic and inflammatory cues in CNS-recruited macrophages to limit neuroinflammation. Nat Immunol.; 16(12):1228-34.

IF: 19.381

Pkt. MNiSW: 50

Udział własny: praca stworzona została przez multidyscyplinarny i wielośrodkowy zespół badawczy i byłem w niej odpowiedzialny za opracowanie technik przyżyciowego obrazowania mikroskopowego rdzenia kręgowego i analizy obrazów, wykonałem badania mikroskopowe i opracowałem wyniki, brałem udział w tworzeniu manuskryptu. Mój wkład własny w zakresie całej pracy szacuję na 15% z uwagi na jej wieloaspektowość i złożoność analizy wpływu białka Nr4a1 na badany fenotyp, a w części badań mikroskopowych na 100%.

7. Mikolajewicz K, **Chodaczek G**. (2019) Going deeper: three-dimensional study of $\gamma\delta$ T cells in mouse reproductive tract using tissue clearing methods. Immunol Cell Biol.; 97(1):104-111.

IF₍₂₀₁₇₎: 3.795

Pkt. MNiSW: 30

Udział własny: koncepcja pracy, kierownictwo wykonania badań, opracowanie technik mikroskopowych i analizy obrazów, wykonanie części obrazowania mikroskopowego, opracowanie części wyników, współudział w opracowaniu manuskryptu. Jestem autorem korespondencyjnym w tej pracy. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Wprowadzenie

Układ immunologiczny to złożony system komórkowy, którego głównym zadaniem jest utrzymanie homeostazy organizmu poprzez zdolność do odróżniania tego, co własne i bezpieczne od tego, co obce i stwarzające zagrożenie. Układ ten tworzony jest przez wiele typów komórek odpornościowych – tzw. immunocytów, które za pomocą specjalnych receptorów oddziałują z otaczającym je środowiskiem i monitorują jego status. Po przekroczeniu odpowiedniego progu pobudzenia przez swoisty ligand dla danego receptora, immunocyty ulegają aktywacji i wchodzą w tryb funkcji efektorowych, pozwalających np. neutralizować lub niszczyć czynniki potencjalnie chorobotwórcze. Taki mechanizm działania

Autoreferat

dotyczy zarówno komórek układu odporności wrodzonej (np. neutrofilów, makrofagów czy komórek NK – ang. *natural killer*), które od razu odpowiadają na bodziec aktywujący, jak i komórek układu odporności nabytej (np. limfocytów T i B), które muszą najpierw „nauczyć się” rozpoznawać zagrożenie, tak by dopiero przy drugim kontakcie z tym samym czynnikiem zareagować szybciej i mocniej w porównaniu do pierwszej grupy komórek.

Większość limfocytów T w stanie podstawowym (nieaktywowanym) przemieszcza się poprzez krew, węzły chłonne lub tkanki obwodowe i pozostaje w gotowości do rozpoznania „obcych” peptydów (antygenów), które są nieobecne w prawidłowych warunkach. Dopiero po rozpoznaniu za pomocą receptora komórki T (ang. *T cell receptor*, TCR) swoistego antygeny pochodzącego np. od wirusa lub bakterii, związanego z cząsteczkami zgodności tkankowej MHC (ang. *major histocompatibility complex*) na komórce prezentującej antygeny, wędrujący limfocyt zatrzymuje się i tworzy tzw. synapsę immunologiczną – wielocząsteczkową strukturę powstającą pomiędzy komórką T a komórką prezentującą antygen. Synapsa umożliwia oddziaływanie TCR z antygenem oraz między cząsteczkami adhezyjnymi i sygnałowymi, obecnymi w błonach komórkowych obu typów komórek, w następstwie czego dochodzi do serii reakcji fosforylacji/defosforylacji białek odpowiadających za aktywację limfocyta. Dopiero zaktywowana komórka T ma zdolność pełnienia różnorodnych funkcji efektorowych prowadzących np. do zniszczenia zainfekowanej komórki (funkcje cytotoksyczne) lub stymulujących limfocyty B do produkcji przeciwciał neutralizujących patogeny (funkcje pomocnicze).

Podczas reakcji zapalnych służących eliminacji zagrożenia dochodzi czasem do nadmiernej aktywacji immunocytów wrodzonych, które uszkodzają własne tkanki w sposób nieswoisty wskutek uwalniania do otoczenia substancji cytotoksycznych. Podobnie, w pewnych sytuacjach ujawniają się limfocyty T z ekspresją receptora antygenowego TCR o swoistości skierowanej na własne tkanki, które wskutek aktywacji mogą prowadzić do rozwoju chorób autoimmunologicznych, takich jak cukrzyca typu pierwszego, stwardnienie rozsiane lub reumatoidalne zapalenie stawów. Prawidłowy proces rozwoju i selekcji komórek T w grasicy eliminuje jednak potencjalnie autoreaktywne limfocyty, które zbyt mocno oddziałują poprzez swój TCR z cząsteczkami MHC prezentującymi własne peptydy. W rezultacie, autoreaktywne komórki T są stosunkowo rzadkie w tkankach obwodowych a częstość występowania schorzeń o charakterze autoagresji jest dość niska.

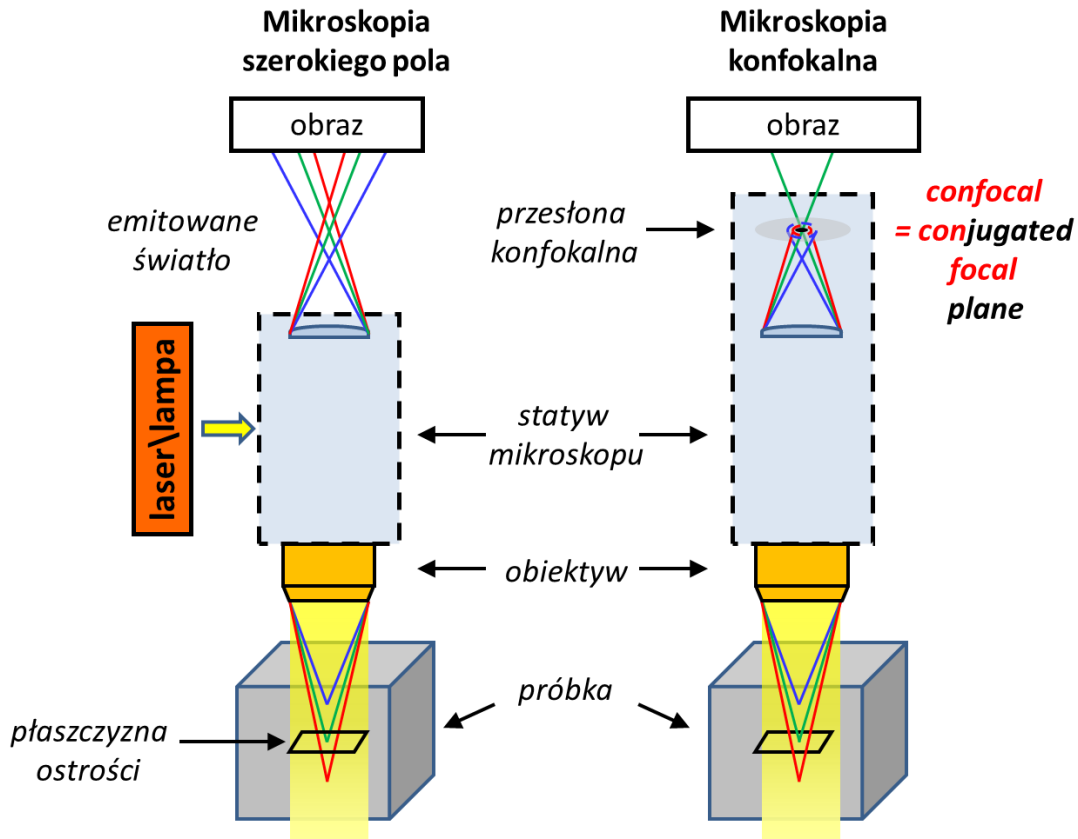
Opisane powyżej mechanizmy odpornościowe zostały poznane dzięki postępowi w badaniach układu immunologicznego, głównie poprzez rozwój technologii wytwarzania przeciwciał i technik wykorzystujących zjawisko fluorescencji, takich jak cytometria przepływowa i mikroskopia. Przeciwciała, czyli białka immunoglobulinowe rozpoznające swoiste antygeny komórkowe, zaczęto sprzęgać z fluoroforami, czyli barwnikami emitującymi określony zakres spektralny światła po wzbudzeniu odpowiednią długością fali. Pozwoliło to m.in. na analizę cytometryczną i wysortowanie pojedynczych komórek wyizolowanych z tkanek bądź krwi na podstawie wyznakowanych immunofluorescencyjnie markerów błonowych, które ściśle definiują wybrane populacje immunocytów. To z kolei umożliwiło ich dalszą, bardziej szczegółową charakterystykę pod względem ekspresji genów

Autoreferat

lub białek np. za pomocą metod biologii molekularnej. Podobnie, dzięki hodowli *in vitro* immunocytów udało się również poznać częściowo mechanizmy prowadzące do ich aktywacji i funkcji efektorowych. Kluczową techniką w tym wypadku była mikroskopia fluorescencyjna, która w warunkach hodowlanych umożliwiła wizualizację zachowania całych komórek a także białek błonowych, biorących udział w oddziaływaniach międzykomórkowych, np. podczas tworzenia synapsy immunologicznej.

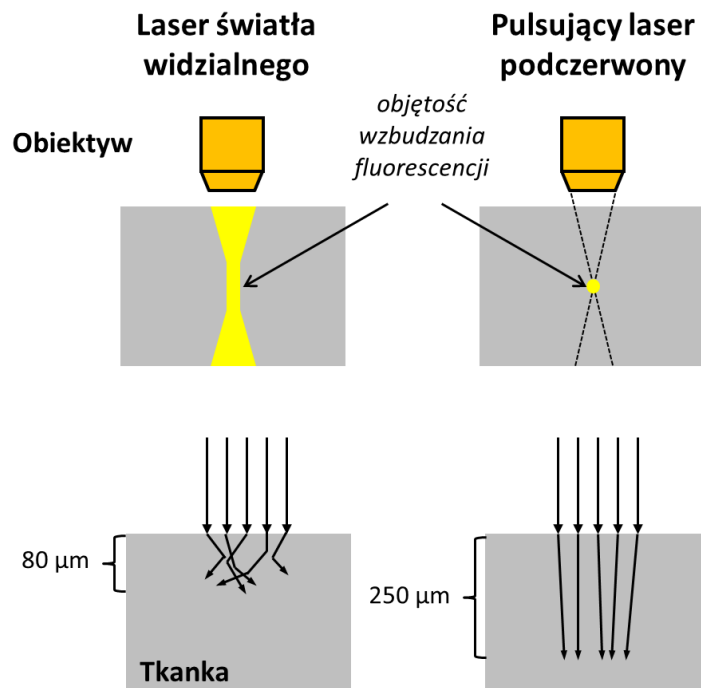
Obserwacje poczynione na wyizolowanych komórkach natychmiast zrodziły pytanie czy podobne zjawiska zachodzą *in vivo*, w naturalnym, trójwymiarowym mikrośrodkowisku komórek, w którym podlegają one o wiele bardziej różnorodnym oddziaływaniom niż na płaskiej, izolowanej powierzchni naczynia hodowlanego. Pierwsze próby zmierzające do wyjaśnienia zachowania immunocytów *in situ*, czyli w miejscu ich występowania, angażowały klasyczne metody histologiczne. Polegają one na odpowiedniej preparacji analizowanych tkanek i pocięciu ich na cienkie, kilkumikronowe skrawki, które następnie barwi się chemicznie, aby wyodrębnić podstawowe struktury tkankowe i komórkowe, takie jak jądra, cytoplazma lub kolagenowe podścielisko (np. barwienie hematoksyliną i eozyną lub barwienie trójbarwne wg Massona). Dzięki barwieniu wykorzystującym przeciwciała znakowane fluorescencyjnie lub sprzężone z enzymem - peroksydazą chrzanową (w celu wywołania miejscowej reakcji barwnej) możliwe stało się obrazowanie ściśle określonych markerów swoistych dla danej populacji komórek i w związku z tym, ich wizualizacja na tle struktur tkankowych, aczkolwiek tylko w obrębie grubości pojedynczego skrawka. Pełna informacja o mikrośrodkowisku tkanki w całej jej objętości, bez destruktywnego cięcia, była niedostępna z uwagi na jej przygotowanie do obrazowania na dostępnych wówczas mikroskopach szerokiego pola, pozwalających na analizę tylko cienkich preparatów.

Przełomem w mikroskopii i obrazowaniu grubych próbek stały się mikroskopy konfokalne i ich modyfikacje umożliwiające mikroskopię dwufotonową. W przeciwieństwie do mikroskopii szerokiego pola, która do wytworzenia obrazu przeważnie używa światła lamp halogenowych o szerokim spektrum światła, mikroskopia konfokalna wykorzystuje światło laserów o ściśle określonej długości fali dostosowanej do spektralnych właściwości wizualizowanych fluoroforów. Zwykle stosowane lasery emitują światło widzialne i podczerwone, najczęściej w zakresie 405–1000 nm (UV-VIS-IR). Penetrująca tkanki wiązka lasera wzbudza wszystkie fluorofory na swojej drodze, więc zbierany sygnał emisji pochodzi z całej objętości tkanki, która podlegała naświetlaniu (Ryc. 1). To powoduje, że rejestrowany obraz w mikroskopie szerokiego pola jest rozmyty i nie można precyzyjnie wskazać przestrzennej lokalizacji obserwowanych obiektów. W celu poprawy kontrastu i zwiększenia rozdzielczości w osi Z w mikroskopie konfokalnym wprowadzono specjalną przesłonę, która powoduje odrzucenie światła nie pochodzącego z płaszczyzny skupiania światła (Ryc. 1). Pozwoliło to na detekcję sygnału z pojedynczej sekcji optycznej na wybranej głębokości w tkance, dzięki czemu można wykonać trójwymiarowe rekonstrukcje obrazowanych tkanek w wysokiej rozdzielczości.



Ryc. 1. Porównanie technik mikroskopowych. Mikroskopia konfokalna pozwala na rejestrację obrazu z poziomej ogniskowej obiektywu i płaszczyzny największej ostrości, podczas gdy w mikroskopii szerokiego pola obraz zawiera sygnał pochodzący również z warstw poniżej i powyżej ogniskowej, przez co kontrast i rozdzielczość ulega pogorszeniu. (Rycina własna).

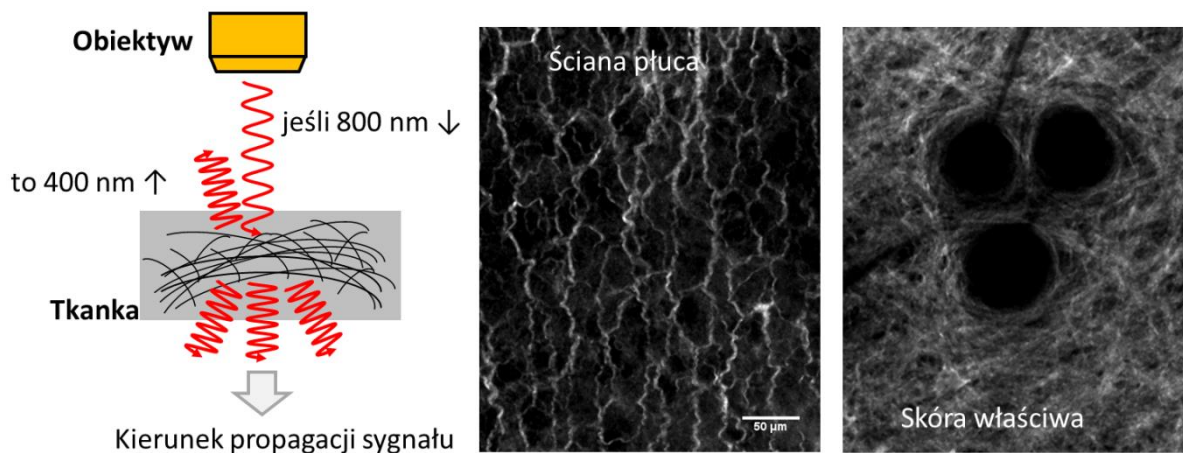
Modyfikacją tej techniki jest zastosowanie pulsującego lasera podczerwonego, umożliwiającego wzbudzenie jednej cząsteczki fluoroforu przez dwa fotony o niższej energii niż światło emitowane. Efekt ten ograniczony jest tylko do ogniskowej obiektywu, w związku z czym fluorofory w pozostałych płaszczyznach nie ulegają wzbudzeniu, więc sygnał tła jest mocno ograniczony oraz nie dochodzi do wyświecania (ang. *photobleaching*) fluoroforów w innych warstwach, co zwykle stanowi problem przy użyciu typowych laserów UV-VIS (Ryc. 2). Największą zaletą mikroskopii dwufotonowej jest jednak głębsza penetracja tkanki przez laser podczerwony w porównaniu do laserów UV-VIS, które z uwagi na większą energię fotonów łatwiej ulegają rozpraszaniu na strukturach tkankowych. W zależności od rodzaju obrazowanej tkanki za pomocą mikroskopii dwufotonowej można rejestrować sygnał nawet na głębokości 1 mm (przeważnie jednak 250 μm), podczas gdy mikroskopia konfokalna wykorzystująca lasery UV-VIS wykrywa obiekty położone na maksymalnie 80 μm głębokości.



Ryc. 2. Porównanie mikroskopii jedno- i dwufotonowej. Pulsujący laser podczerwony umożliwia wzbudzanie fluoroforów tylko w ogniskowej obiektywu (mniejszy sygnał tła i mniejsze wyświecanie fluoroforów z warstw poniżej i powyżej płaszczyzny ogniskowej) oraz głębiej penetruje tkanki z uwagi na mniejszą energię wiązki i mniejsze rozpraszanie. (Rycina własna).

Dodatkowo, wspomniany laser podczerwony umożliwia generację drugiej harmonicznej (ang. *second harmonic generation*, SHG), czyli wytworzenie fali światła o długości równej połowie długości naświetlania wskutek interakcji światła z włóknistymi strukturami bez centrum symetrii, takich jak np. kolagen. Zjawisko to pozwala na wizualizację kolagenowego rusztowania tkanek bez dodatkowego barwienia, np. w skórze właściwej lub wokół różnych organów (płuca, węzły chłonne) (Ryc. 3). Mikroskopia dwufotonowa generuje również sygnał autofluorescencyjny o wiele bardziej niż mikroskopia jednofotonowa z laserami UV-VIS. Ten rodzaj sygnału jest bardzo powszechny, lecz nieswoisty, przez co nie pozwala na różnicowanie obrazowanych typów komórek. Wyjątkiem mogą być makrofagi, które niekiedy identyfikuje się na podstawie autofluorescencyjnych ziarnistości. Endogenne fluorofory i sygnał drugiej harmonicznej są z jednej strony bardzo użyteczne, ponieważ tworzą tło i kontekst dla komórek będących przedmiotem analiz; z drugiej jednak strony, zwiększają rozpraszanie światła w tkankach, przez co zmniejszają głębokość penetracji lasera i detekcję sygnału z głębokich warstw. Te ograniczenia są aktualnie skutecznie usuwane przez rozwój metod służących optycznemu oczyszczaniu tkanek. Dzięki inkubacji utrwalonych tkanek w roztworach substancji usuwających lipidy lub wyrównujących współczynnik załamania światła w całej objętości tkanki można je uczynić przezroczystymi, co jeszcze bardziej pomaga w obrazowaniu grubych tkanek i umożliwia wizualizację nawet całych organów. Wiele metod oczyszczania zostało opracowanych

głównie w celu obrazowania tkanki nerwowej mózgu i wizualizacji delikatnych połączeń neuronalnych, które uległyby zniszczeniu podczas histologicznej preparacji.



Ryc. 3. Generacja drugiej harmonicznej i wizualizacja kolagenu w tkankach. (Rycina własna).

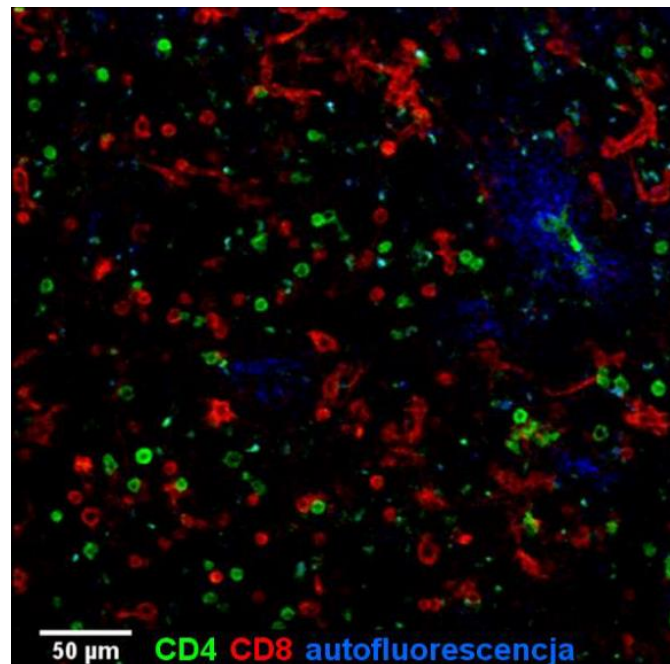
Badania komórek układu odpornościowego hodowanych w warunkach zbliżonych do fizjologicznych pokazały, że immunocyty po aktywacji potrafią być bardzo ruchliwe. Było to możliwe dzięki sekwencyjnemu zapisowi obrazów mikroskopowych w określonym interwale czasu. Dało to początek rozwojowi mikroskopii przyżyciowej (ang. *live microscopy*), rozumianej jako wizualizacja dynamicznych procesów na poziomie komórkowym i subkomórkowym, rejestrowanych zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Pierwsze obserwacje dynamiki komórek *in vivo* (ang. *intravital microscopy*) przeprowadzano za pomocą mikroskopii szerokiego pola, studiując głównie ruch komórek w naczyniach krwionośnych, np. w mięśniu dźwigacza jądra u myszy lub szczurów, nagrywając obraz analogowymi kamerami video. W tym rodzaju mikroskopii kontrast i rozróżnienie obiektów uzyskiwane było na podstawie różnic pochłaniania i rozpraszania światła, stąd też konieczność by analizowana tkanka była możliwie jak najcieńsza i przepuszczalna dla światła. Dzięki tej technice zdefiniowano podstawowe etapy migracji komórek z łożyska naczynia do tkanek, takie jak toczenie się leukocytów po powierzchni śródbłónka czy ich adhezja do komórek śródbłónka. Metoda ta nie znalazła jednak szerszego zastosowania, ponieważ zdecydowana większość tkanek i organów z uwagi na położenie i właściwości optyczne nie nadawała się do tego typu mikroskopii. W konsekwencji poszukiwano alternatywnych technik pozwalających uzyskać obraz z tkanek nieprzezroczystych a jednocześnie dających możliwość lepszej identyfikacji analizowanych struktur.

Podobnie jak w przypadku statycznego obrazowania, mikroskopia konfokalna i dwufotonowa dały znacznie lepsze rezultaty w mikroskopii przyżyciowej i są one aktualnie podstawowymi metodami w tym typie obrazowania. Konieczność utrzymania obiektu obserwacji przy życiu i chęć rejestracji obrazów ruszających się obiektów wymusiły szereg nowych rozwiązań technicznych w budowie mikroskopu. Przede wszystkim stosuje się odpowiedni skaner, który kieruje wiązką lasera w trybie rezonansowym, bardzo szybko oscylując (przeważnie z częstotliwością 8-16 kHz), co kilkakrotnie zwiększa prędkość

Autoreferat

skanowania w porównaniu do skanerów konwencjonalnych oraz skraca długość kontaktu światła lasera z tkanką, prowadząc do zmniejszenia fototoksyczności podczas obserwacji. Kładzie się również nacisk na detekcję sygnałów o małej intensywności, które są bardzo powszechne z uwagi na większe rozpraszanie światła w żywych tkankach. Polepszenie rejestracji słabego sygnału uzyskuje się poprzez zastosowanie obiektywów o wysokiej aperturze numerycznej, pozwalającej efektywnie zbierać emitowane wielokierunkowe światło, i użycie detektorów nowej generacji (fotopowielaczy Ga-As-P) ze zwiększoną czułością. Konfiguracja mikroskopu równocześnie jest tak planowana, aby umożliwiała łatwy dostęp i manipulację przy obiekcie badań, spoczywającym na podgrzewanym stoliku mikroskopowym i podłączonym do aparatury z anestezją lub do dodatkowych akcesoriów (np. stabilizatora organów podlegających obserwacji lub respiratora).

W przypadku badań nad komórkami układu immunologicznego próbuje się wizualizować je *in vivo* na kilka sposobów, przede wszystkim w myszach laboratoryjnych. Najprostszą metodą jest wyznakowanie analizowanej populacji komórek poprzez wstrzyknięcie wyznakowanego fluorescencyjnie przeciwciała rozpoznającego swoiste antygeny powierzchniowe na badanych komórkach. W ten sposób można np. identyfikować limfocyty z markerami CD4 i CD8 w krwiobiegu lub śledzionie (Ryc. 4). Ograniczeniem tej metody jest konieczność kontaktu analizowanych komórek z krwią, więc komórki przebywające poza naczyniami krwionośnymi, np. w węzle chłonnym, nie wiążą podanego przeciwciała i nie barwią się. Przeciwciała ulegają także internalizacji i degradacji wewnątrzkomórkowej, dlatego ich sygnał utrzymuje się zazwyczaj do kilku godzin. Ponadto, przeciwciała niosą ryzyko sieciowania i aktywacji swoistych dla siebie receptorów powierzchniowych, przez co mogą zmieniać status badanych komórek.



Ryc. 4. Przyżyciowe obrazowanie komórek $CD4^+$ i $CD8^+$ w śledzionie za pomocą fluorescencyjnie znakowanych przeciwciał. (Rycina własna).

Autoreferat

Inną metodą wizualizacji komórek układu immunologicznego jest izolacja leukocytów z organizmu dawcy i ich znakowanie *in vitro* za pomocą odpowiednich barwników fluorescencyjnych, np. CFSE, CMRA czy SNARF-1. Wyznakowane komórki wprowadza się następnie do organizmu biorecy i analizuje ich ruchliwość oraz oddziaływania międzykomórkowe w wybranej tkance. Procedura ta, podobnie jak znakowanie przeciwciałami, może indukować zmiany w zachowaniu analizowanych komórek. Poza tym, barwniki są stopniowo usuwane z cytoplazmy, więc komórki można obserwować *in vivo* przeważnie nie dłużej niż dwa dni.

Odkrycie białek fluorescencyjnych i rozwój inżynierii genetycznej pozwoliły na wyznaczenie pożądanych populacji komórek poprzez endogenną ekspresję białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP) lub jego pochodnych (cyjanowe/CFP, żółte/YFP, czerwone/RFP) bez konieczności dodatkowych manipulacji. Stworzone zostały specjalne transgeniczne szczepy myszy, tzw. myszy reporterowe, w których poszczególne typy immunocytów, definiowane na podstawie białek powierzchniowych lub czynników transkrypcyjnych, wytwarzają i gromadzą (najczęściej w cytoplazmie) duże ilości białka fluorescencyjnego, dzięki czemu można śledzić ich los w organizmie przez cały okres życia komórkowego. Przykładowo, komórki dendrytyczne, których rolą jest prezentacja antygenów limfocytom, można zobrazować w myszy CD11c-YFP (ekspresja YFP w komórkach wytwarzających CD11c). Z kolei, szczep LysM-GFP zawiera fluorescencyjne neutrofile i makrofagi (ekspresja GFP w komórkach wytwarzających lizozym M); natomiast limfocyty T można wizualizować np. w myszy CD2-DsRed (ekspresja DsRed w komórkach z aktywnym promotorem transgenu CD2).

Użyteczność mikroskopii przyżyciowej pokazują prace opisujące zachowanie immunocytów podczas indukcji odpowiedzi immunologicznej na modelowy antygen. W 2002 r. Miller i współpracownicy w artykule opublikowanym w *Science* po raz pierwszy zademonstrowali różnice w ruchliwości limfocytów T i B w obrębie węzła chłonnego. Wykazano, że oba typy komórek przy braku swoistego, aktywującego je antygeny poruszały się przypadkowo – bez dominującego kierunku. Komórki T migrowały z większą prędkością niż komórki B ($10,8 \pm 0,1 \mu\text{m}/\text{min}$ w porównaniu do $6,4 \pm 0,07 \mu\text{m}/\text{min}$, odpowiednio) i były w stanie pokonać większe odległości w danej jednostce czasu. Obecność swoistego antygeny w węzle chłonnym spowodowała przekształcenie się komórek T w tzw. blasty, co objawia się m.in. przyrostem objętości komórki. Ponadto, wzrósł wówczas odsetek nieruchomych limfocytów z 3% (przy braku antygeny) do 25% (przy lokalnej prezentacji antygeny w węzle). Limfocyty T tworzyły wielokomórkowe klastry skupione najprawdopodobniej wokół komórek dendrytycznych, eksponujących peptydy powstałe z aktywującego antygeny. Zostało to potwierdzone w pracy Stoll i współpracowników (*Science*, 2002), którzy zobrazowali w węzle chłonnym zarówno komórki prezentujące antygeny, jak i aktywowane przez nie limfocyty T. Oba artykuły były przełomowe dla naszego zrozumienia biologii immunocytów, mimo że samo obrazowanie prowadzono na wyizolowanych od myszy węzłach chłonnych utrzymywanych *in vitro* w warunkach fizjologicznych. Od tamtej pory nastąpił gwałtowny rozwój tej dziedziny mikroskopii i aktualnie w publikowanych pracach dominuje obrazowanie *in vivo*, które najlepiej odzwierciedla procesy życiowe. Jest ono

Autoreferat

trudniejsze do przeprowadzenia niż mikroskopia *ex vivo* lub *in vitro* z uwagi na konieczność podtrzymania wszystkich funkcji życiowych uśpionej myszy laboratoryjnej, niejednokrotnie poddanej skomplikowanej operacji chirurgicznej w celu odsłonięcia tkanki lub organu na potrzeby mikroskopii, tak jak w przypadku obrazowania płuc.

Równolegle do postępów w samej technice obrazowania przyżyciowego rozwijała się również analiza zdjęć mikroskopowych. Mikroskopia przestała być techniką, która dostarczała tylko obrazy na potwierdzenie jakiejś hipotezy. Interpretacja zdjęcia musiała mieć podparcie liczbowe, wolne od subiektywizmu. Dzięki odpowiedniemu przetwarzaniu zdjęć prędkość ruchu komórek została dokładnie policzona. Podobnie, rodzaj migracji (kierunkowa, przypadkowa czy ograniczona) został wyrażony liczbowo na podstawie pomiaru przemieszczenia komórki z miejsca startu do miejsca, do którego komórka dotarła w danym punkcie czasowym. Początkowo analiza zdjęć polegała na manualnych pomiarach, polegających na ręcznym obrysowywaniu ciała komórek w celu określenia zmian ich pozycji lub morfologii w czasie. Był to bardzo żmudny proces, który nie pozwalał na uzyskanie dużej ilości danych potrzebnych do przeprowadzenia wiarygodnej analizy statystycznej. Aktualnie istniejące oprogramowania do przetwarzania obrazów mikroskopowych znacznie ułatwiają opracowanie liczbowe zdjęć, aczkolwiek, w dalszym ciągu jest to przeważnie proces półautomatyczny i niejednokrotnie wymagający sprawdzenia metodą prób i błędów czy wybrany algorytm prowadzi do pożądanego celu.

Różnorodność komórek tworzących układ immunologiczny, ich wszechobecność w organizmie oraz rozmaite współzależności między nimi dają poczucie, że wciąż niewiele wiemy o jego funkcjonowaniu. Od 2002 r. zostało opublikowanych wiele prac, które powoli odsłaniają prawdziwy obraz immunocytów w akcji – w ściśle określonym miejscu i czasie, aczkolwiek dalej w skali świata mikro. Badania mikroskopowe, kiedyś bardzo niszowe, teraz stają się coraz bardziej powszechne. Mój wkład w rozwój tej dziedziny koncentruje się opracowaniu technik obrazowania zarówno statycznego jak i dynamicznego różnych komórek układu odpornościowego w celu bezpośredniego uwidocznienia i zrozumienia mechanizmów ich działania.

Cel naukowy

Przedstawione publikacje, wchodzące w skład mojego osiągnięcia naukowego i stanowiące podstawę o ubieganie się o stopień naukowy doktora habilitowanego, zbierają moje dokonania w rozwoju nowych technik mikroskopowych do wizualizacji i badań funkcjonalnych komórek układu odpornościowego. W niektórych pracach mikroskopia była wiodącym narzędziem badawczym, w innych była jedną z kilku równoważnych technik, opisujących nieznaną dotąd biologię badanych komórek immunologicznych.

Szczegółowe cele naukowe to:

1. Wizualizacja *in vitro* wpływu mitochondrialnego stresu oksydacyjnego na poziom pH ziarnistości wewnątrzcytoplazmatycznych komórek tucznych (Publikacja 1).
2. Wizualizacja *in vivo* monitorowania bariery skórnej przez naskórkowe limfocyty T $\gamma\delta$ (Publikacja 2).

Autoreferat

3. Wizualizacja *in vivo* ruchu ziarnistości wewnątrzcytoplazmatycznych w naskórkowych limfocytach T $\gamma\delta$ (Publikacja 3).
4. Opracowanie techniki wizualizacji *in vivo* limfocytów T w mikrośrodowisku guza płuc (Publikacja 4).
5. Wizualizacja *in vivo* kontroli metastaz nowotworowych do płuc przez monocyty patrolujące (Publikacja 5).
6. Wizualizacja *in vivo* infiltracji rdzenia kręgowego przez autoreaktywne limfocyty T i aktywacji komórek mikrogleju w mysim modelu stwardnienia rozsianego (Publikacja 6).
7. Opracowanie techniki oczyszczania optycznego pochwy w celu wizualizacji limfocytów T $\gamma\delta$ w układzie rozrodczym (Publikacja 7).

Uzyskane wyniki

Publikacja 1: Chodaczek G, Bacsı A, Dharajiya N, Sur S, Hazra TK, Boldogh I. (2009) Ragweed pollen-mediated IgE-independent release of biogenic amines from mast cells via induction of mitochondrial dysfunction. Mol Immunol.; 46(13):2505-14.

Głównym celem tej pracy było sprawdzenie wpływu pyłków ambrozji bylicolistnej na wydzielanie mediatorów reakcji alergicznych przez komórki tuczne (mastocyty). Klasyczna aktywacja tych komórek przez przeciwciała IgE, wiążące białka alergenowe, indukuje proces degranulacji, polegający na fuzji ziarnistości wewnątrzcytoplazmatycznych z błoną komórkową i uwolnienie ich zawartości na zewnątrz. W ten sposób do środowiska zewnątrzkomórkowego trafiają czynniki odpowiedzialne za objawy alergii, takie jak histamina i serotonina oraz szereg enzymów powodujących odczyn zapalny. W pracy wykazałem, że możliwy jest również inny mechanizm uwalniania dotyczący tylko małych cząsteczek (histaminy i serotoniny), niezależny od obecności swoistych przeciwciał. Pyłki ambrozji, które są modelowym alergenem, mają zdolność indukcji wolnych rodników poprzez hamujący wpływ na aktywność mitochondrialnego kompleksu III, enzymu ze szlaku energetycznego odpowiedzialnego za syntezę ATP. Za pomocą serii eksperymentów wykorzystujących techniki fluorescencyjne zademonstrowałem, że wytworzone w mitochondriach wolne rodniki (H_2O_2) hamują enzym V-ATPazę (pęcherzykowa H^+ -ATPaza), który jest odpowiedzialny za utrzymanie niskiego pH w ziarnistościach komórek tucznych. Przy wzroście pH w pęcherzykach wewnątrzcytoplazmatycznych pod wpływem inhibicji V-ATPazy histamina i serotonina nie mogą być aktywnie zatrzymane w ich wnętrzu i wyciekają na zewnątrz komórek, dając odczyn zapalny. Zastosowanie mikroskopii fluorescencyjnej umożliwiło wykazanie zmian pH w ziarnistościach pod wpływem mitochondrialnych wolnych rodników (Fig. 8 w oryginalnej pracy). Do mikroskopowego pomiaru pH w komórkach tucznych wykorzystałem oranż akrydyny, który w środowisku kwaśnym tworzy agregaty i jest fluorescencyjny w zakresie czerwieni (ok. 630 nm). Wzrost pH powoduje przejście oranżu w formę monomeryczną i emisję fluorescencji w zakresie zielonym (ok. 530 nm). Przyżyciowe obrazowanie hodowli mastocytów, naładowanych oranżem, wykazało obecność czerwonych – kwaśnych ziarnistości, które znikaly pod

Autoreferat

wpływem stymulacji komórek do produkcji mitochondrialnych wolnych rodników lub po zahamowaniu V-ATPazy jej swoistym inhibitorem. Wzrost zasadowości komórek i zwiększony sygnał zielony potwierdziłem liczbowo poprzez pomiar intensywności fluorescencji.

Podsumowując, wizualizacja wpływu mitochondrialnego stresu oksydacyjnego na poziom pH ziarnistości wewnątrzcytoplazmatycznych komórek tłuszczowych w sposób jednoznaczny i dobitny potwierdziła stawianą tezę o niezależnej od przeciwciał degranulacji mastocytów. Opisany w pracy mechanizm uwalniania czynników alergicznych sugeruje, że przeciwdziałanie indukcji wolnych rodników może otwierać nowe możliwości terapeutyczne alergii.

Publikacja 2: Chodaczek G, Papanna V, Zal MA, Zal T. (2012) Body-barrier surveillance by epidermal $\gamma\delta$ TCRs. Nat Immunol.; 13(3):272-82.

Praca poświęcona jest analizie mikroskopowej naskórkowych dendrytycznych komórek T $\gamma\delta$. Limfocyty te stanowią wciąż zagadkową grupę komórek T, które charakteryzują się zarówno cechami wrodzonego, jak i nabytego układu odpornościowego. Odgrywają one bardzo ważną rolę w funkcjonowaniu i immunologii nabłonków poprzez zdolność do szybkiej odpowiedzi na stres środowiskowy wywołany np. infekcją bądź zranieniem. Do roku 2012 uważano, że ich zasadnicza funkcja wiąże się z rozpoznawaniem i reagowaniem na własne antygeny uwalniające się podczas reakcji na czynniki stresowe, np. podczas uszkodzenia tkanki. Przyjęto, że związanie antygenów stresowych przez TCR $\gamma\delta$ aktywuje limfocyty pobudzając je m.in. do wydzielania czynników wzrostowych dla nabłonka lub cytotoksycznych w stosunku do obcych komórek np. patogenów lub własnych - zmienionych nowotworowo. W moich badaniach naskórkowych limfocytów T $\gamma\delta$ zastosowałem przede wszystkim analizy mikroskopowe i nowe podejście do preparacji skóry – zrezygnowałem z izolacji naskórka a zamiast tego analizowałem szybko utrwaloną skórę w całej swojej grubości (ang. *whole mount*). Dzięki temu, stosując immunofluorescencję i przeciwciała rozpoznające ufosforylowane formy białek receptorowych wykazałem, że komórki T $\gamma\delta$ przebywają w zdrowych nabłonkach w stanie ciągłej aktywacji. Ponadto, opracowałem technikę obserwacji *in vivo* komórek w skórze i korelując przyżyciowe obrazy z tymi po barwieniu immunofluorescencyjnym zademonstrowałem jako pierwszy, że limfocyty T $\gamma\delta$ tworzą w zdrowej skórze liczne konstytutywne synapsy immunologiczne powstające na końcach unieruchomionych wypustek w warstwie terminalnie zróżnicowanych keratynocytów. Wysokorozdzielcza mikroskopia konfokalna wykazała, że odkryte struktury charakteryzowały się wyraźnym skupieniem TCR $\gamma\delta$, oddzieleniem fosfatazy CD45 i aktywacją kluczowych kinaz tyrozynowych w szlaku aktywacji TCR. Obecność synaps powodowała, że komórki T $\gamma\delta$ ulegały aktywacji i były przez to w naskórku nieruchome, w odróżnieniu np. od komórek T $\alpha\beta$, które okazjonalnie były znajdowane w tej samej lokalizacji i wykazywały dużą ruchliwość.

Praca ta była pierwszą bezpośrednią demonstracją konstytutywnej aktywacji i autoreaktywności skórnych komórek T $\gamma\delta$. Pobudzenie TCR $\gamma\delta$ w zdrowej skórze było bardzo wysokie i zasadniczo nie wzrastało w zranionej tkance, wbrew wiodącej hipotezie,

Autoreferat

zgodnie z którą TCR $\gamma\delta$ pełni rolę receptora stresu komórkowego. Mikroskopowe dane eksperymentalne wykazały, że zranienie i infekcja prowadzą do zmiany morfologii komórek i redystrybucji miejsc aktywacji TCR $\gamma\delta$. Wskutek stresu środowiskowego synapsy zanikały w miarę wycofywania się dendrytów i zaokrąglania się komórek a TCR ulegał pobudzeniu na całym ciele limfocytu, już bez wypustek. W modelu infekcji obserwowano także tworzenie się koniugatów limfocytów T $\gamma\delta$ i komórek Langerhansa (naskórkowych komórek prezentujących antygeny), które w miejscu styku zawierały aktywowany TCR na podobieństwo klasycznych synaps immunologicznych. Uzyskane wyniki pozwoliły wysunąć nową hipotezę o konstytutywnym ligandzie, który jest stale obecny w tkance, lecz ma różną dystrybucję, zależnie od warunków środowiska.

Unikatowość tej publikacji polega na pionierskim zobrazowaniu funkcji naskórkowych limfocytów T $\gamma\delta$ za pomocą opracowanej przeze mnie całkowicie nowatorskiej metody, łączącej mikroskopię przyżyciową i immunofluorescencję na utrwalonych tkankach, nazwanej mikroskopią iDISC (ang. *intravital dynamics-immunosignal correlative microscopy*). Wykazałem, że jest możliwa rejestracja ruchu komórek skórných w żywej transgenicznej myszy (dzięki cytoplazmatycznej ekspresji GFP), a później utrwalenie obrazowanego fragmentu tkanki, wybarwienie znakowanymi fluorescencyjnie przeciwciałami i odnalezienie w przygotowanym preparacie tych samych komórek, które były śledzone *in vivo*. W ten sposób potwierdziłem, że unieruchomione wypustki limfocytów zawierają aktywowane cząsteczki receptora TCR w formie synaps immunologicznych. W pracy przeprowadziłem również złożone, półautomatyczne analizy zdjęć pozwalające na analizę tysięcy komórek oraz opracowałem nowe metody wizualizacji ruchu komórek. Oprócz samego faktu, że pracę przyjęto do *Nature Immunology*, artykuł był dodatkowo doceniony na łamach tego czasopisma w tym samym numerze w postaci obszernego komentarza „*News and Views*” napisanego przez dwóch światowych ekspertów od biologii komórek T $\gamma\delta$. Z kolei, czasopismo *Science* umieściło w sekcji „*Perspectives and Commentary*” wzmiankę dotyczącą uzyskanych przeze mnie danych i opracowanej techniki obrazowania (*Science* 2012: 335, 6072, pp. 1020).

W mojej ocenie jest to przełomowa praca dla zrozumienia funkcji limfocytów T $\gamma\delta$, wyjaśniająca aktywowany fenotyp tych komórek w stanie podstawowym. Od strony metodologicznej po raz pierwszy pokazano, że technika mikroskopii przyżyciowej może być łączona z technikami immunofluorescencyjnymi, dzięki czemu można o wiele lepiej scharakteryzować procesy biologiczne wizualizowane *in vivo*, również w innych tkankach niż skóra.

Publikacja 3: Chodaczek G, Toporkiewicz M, Zal MA, Zal T. (2018) Epidermal T Cell Dendrites Serve as Conduits for Bidirectional Trafficking of Granular Cargo. Front. Immunol.; 9:1430.

Praca ta jest kontynuacją badań opublikowanych w *Nature Immunology*, w których m.in. odkryłem, że komórki T $\gamma\delta$ tworzą synapsy immunologiczne w warstwie terminalnie zróżnicowanych keratynocytów i gromadzą w nich ziarnistości lizosomalne oraz pęcherzyki zawierające gangliozyd GM1, będący markerem raft lipidowych. Przedmiotem tej pracy było

Autoreferat

opracowanie metodologii obrazowania ruchu granul cytoplazmatycznych wewnątrz naskórkowych dendrytycznych limfocytów T $\gamma\delta$ w celu określenia dynamiki akumulacji ziarnistości względem zmian położenia wypustek tych komórek. W toku badań na transgenicznym myszom IL2p8-GFP, w których GFP jest obecne w cytoplazmie naskórkowych limfocytów T $\gamma\delta$, zademonstrowałem, że znakowanie pęcherzyków *in vivo* można przeprowadzić poprzez wstrzyknięcie intradermalne znakowanego fluorescencyjnie przeciwciała anti-TCR $\gamma\delta$ oraz znakowanej podjednostki B toksyny cholery (CTB), która wiąże gangliozyd GM1. Oba reagenty wiązały swoje dla siebie receptory błonowe na powierzchni komórek T $\gamma\delta$ i ulegały internalizacji do cytoplazmy, trafiając po kilku dniach do puli pęcherzyków wewnątrzkomórkowych, które można było zidentyfikować na podstawie sygnału znaczników fluorescencyjnych podłączonych do wstrzykniętych odczynników (Alexa Fluor 555 i Alexa Fluor 647). Analiza immunofluorescencyjna wykazała, że pęcherzyki po internalizacji TCR i GM1 częściowo ko-lokalizowały z granulami lizosomalnymi zawierającymi marker LAMP-1. W oddzielnych eksperymentach wybarwiłem lizosomy przez wstrzyknięcie roztworu Lysotracker – substancji używanej do wizualizacji lizosomów w hodowlach komórkowych *in vitro*. Wszystkie trzy typy ziarnistości w obrębie limfocytów T $\gamma\delta$ obrazowałem następnie przyżyciowo w myszach pod anestezją i określiłem ich prędkości chwilowe – mediana wyniosła ok. 1 $\mu\text{m}/\text{min}$, niezależnie od typu granul. Na podstawie nagrań *in vivo* dowiodłem, że ziarnistości przemieszczały się do nowo tworzących się wypustek i pozostawały w nich po stabilizacji zakotwiczenia dendrytu. Kierunkowość ruchu granul w skali całych komórek zbadałem w serii eksperymentów wykorzystujących technikę FRAP (ang. *fluorescence recovery after photobleaching*). W tym celu sygnał fluorescencyjny zawarty w ziarnistościach był lokalnie wygaszany w wybranym obszarze ciała komórki (koniec dendrytu lub obszar okołojądrowy), a następnie mierzyłem intensywność powracającej fluorescencji w funkcji czasu. Eksperymenty te wykazały, że pęcherzyki zawierające zinternalizowane fluorofory poruszały się w dwóch przeciwbieżnych kierunkach – z obszaru okołojądrowego do zakończeń dendrytów, gdzie tworzyły lokalny rezerwuuar, i z powrotem. Dodatkowo, dla porównania z limfocytami T $\gamma\delta$, analogiczne procedury wykonałem na komórkach w skórze właściwej, które również akumulowały CTB i miały wyznaczone ziarnistości cytoplazmatyczne. Pomiar FRAP pokazał, że dynamika granul w obrębie komórek T $\gamma\delta$ była blisko dwukrotnie większa w porównaniu do komórek dermalnych.

Opracowana przeze mnie nowatorska metodologia znakowania i obrazowania pęcherzyków wewnątrzcytoplazmatycznych jest pierwszą tego typu demonstracją transportu materiału granularnego *in vivo* w obrębie naskórkowych limfocytów. Technologia ta może być z powodzeniem wykorzystana do kolejnych badań porównujących funkcje komórek T $\gamma\delta$ w zdrowej tkance do warunków stresu środowiskowego, np. po zranieniu lub infekcji.

Publikacja 4: Zal T, Chodaczek G. (2010) Intravital imaging of anti-tumor immune response and the tumor microenvironment. Semin Immunopathol.; 32(3):305-17.

Praca stanowi przegląd literatury naukowej (do roku 2010) poświęconej obrazowaniu *in vivo* mikrośrodowiska guzów nowotworowych i reakcjom przeciwnowotworowym układu

Autoreferat

odpornościowego i była pisana z perspektywy osób zajmujących tego typu mikroskopią. Badania mikroskopowe w tej tematyce dostarczyły wielu fundamentalnych informacji, na podstawie których budujemy naszą wiedzę o biologii nowotworów. Wzrost guza, jego inwazyjność i przerzuty są dynamicznymi procesami obejmującymi interakcje komórek nowotworowych z macierzą pozakomórkową, układem naczyniowym i różnymi typami niezmiennych nowotworowo komórek gospodarza, które tworzą zrąb guza. Często obecnym składnikiem zrębu są komórki odpornościowe, zarówno mieloidalne jak i limfoidalne, jednak odpowiedź immunologiczna jest zwykle nieskuteczna w zwalczaniu nowotworów, a co więcej, może nawet przyczyniać się do dalszego wzrostu niektórych nowotworów. W pracy przywołaliśmy wiele przykładów badań dotyczących migracji komórek nowotworowych oraz oddziaływań nowotwór-komórki mieloidalne i nowotwór-limfocyty, które mogą być inspiracją dla innych naukowców do prowadzenia takich eksperymentów.

Od strony rozwoju metodologii mikroskopowej publikacja ta była pierwszą okazją zademonstrowania naszej techniki przyżyciowej wizualizacji odpowiedzi immunologicznej w stosunku do rozwijających się płucnych metastaz nowotworowych. W publikacji umieściliśmy jako pierwsi zdjęcia obrazujące ruch limfocytów T CD8⁺ w bezpośrednim otoczeniu metastatycznych komórek guza, zagnieżdżających się w tkance płucnej w żywej myszy. Aby przeprowadzić tego typu badanie, uśpiona mysz była mechanicznie wentylowana i poddana operacji chirurgicznej w celu stworzenia okienka w klatce piersiowej i odsłonięcia płuca. Następnie, za pomocą specjalnie skonstruowanej ssawki w kształcie pierścienia z nałożonym szkiełkiem nakrywkowym, widoczna przez okienko górna powierzchnia pracującego płuca była unieruchamiana przez ssawkę zamontowaną na stoliku mikroskopowym, umożliwiając ruch płuca od spodu. System ten pozwalał na wizualizację miąższu płucnego do ok. 100-150 μm w głąb od kolagenowej kapsuły pokrywającej płat płuca, zachowując przepływ krwi w kapilarach. Naszym modelem metastaz płucnych były wstrzyknięte dożylnie komórki włókniakomięsaka metylocholanrenowego (*fibrosarcoma MCA*), wytwarzającego fluorescencyjne białko mCerulean. Nowotwór był podany do krwiobiegu podwójnie reporterowej, transgenicznej myszy hCD2p-DsRed × CD8β-YFP, w której limfocyty T były widoczne dzięki ekspresji białka czerwonej fluorescencji DsRed a ich subpopulacja komórek CD8⁺ miała białko żółtej fluorescencji YFP, skoniugowane z łańcuchem CD8β i obecne w błonie przez parowanie z łańcuchami CD8α. W takim układzie endogennej trójkolorowej fluorescencji możliwe więc było śledzenie ruchu cytotoksycznych limfocytów T i ich interakcje z metastazami, bez konieczności dobarwiania obrazowanych komórek. Przedstawione dane były też przykładem korzyści płynących ze stosowania szybkiej, rezonansowej mikroskopii konfokalnej do analiz przyżyciowych.

Zaprezentowaną w tej pracy metodologię i możliwości obrazowania organów, które naturalnie poruszają się wskutek oddychania, wykorzystałem w swoich kolejnych pracach, dotyczących nie tylko analiz komórek układu odpornościowego w płucach, ale również w badaniach rdzenia kręgowego w modelu stwardnienia rozsianego oraz w badaniach trzustki w modelu cukrzycy typu 1.

Publikacja 5: Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, Herrley E, Rasquinha N, McArdle S, Wu R, Peluso E, Metzger D, Ichinose H, Shaked I, **Chodaczek G**, Biswas SK, Hedrick CC. (2015) Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. Science; 350(6263):985-90.

Praca ta stanowi bezpośredni przykład zastosowania techniki obrazowania przyżyciowego płuc, którą wdrożyłem w kierowanej przeze mnie pracowni mikroskopowej w La Jolla Institute for Allergy & Immunology w San Diego, USA. Jednym z tematów badawczych, którymi zajmowałem się tam od strony mikroskopii, była rola białka Nr4a1 w rozwoju i funkcjach tzw. patrolujących monocytów (we współpracy z prof. Catherine Hedrick). Nr4a1 jest sierocym receptorem jądrowym, dla którego ligand nie został jeszcze poznany. Białko to jest niezbędne do powstania subpopulacji monocytów, które mają zdolność do patrolowania ścian naczyń krwionośnych, w odróżnieniu od klasycznych, prozapalnych monocytów, które różnicują się do makrofagów po wyjściu z łożyska naczyniowego. U myszy z delecją Nr4a1 komórki te nie rozwijają się. W toku prac eksperymentalnych w laboratorium prof. Hedrick zauważono, że u myszy bez białka Nr4a1 dochodzi do częstszych przerzutów komórek nowotworowych do płuc. W związku z tym sformułowano hipotezę, że patrolujące monocyty odgrywają rolę w hamowaniu metastaz płucnych. Do badań weryfikujących to założenie wykorzystano myszy reporterowe Nr4a1-GFP, w których białko GFP ulega ekspresji w sprzężeniu z aktywacją promotora Nr4a1 i jest wytwarzane w dużych ilościach przez patrolujące monocyty, ale nie przez inne typy monocytów. Modelem metastaz płucnych było dożylnie podanie komórek rakowych LLC (Lewis *lung carcinoma*) wytwarzających białko czerwonej fluorescencji RFP. Po podaniu do krwioobiegu komórki LLC w większości zatrzymywały się w gęstej sieci kapilar płucnych. Statyczne analizy mikroskopowe wykazały, że liczba patrolujących monocytów w płucach wzrosła znacząco po 24 godzinach od wstrzyknięcia komórek LLC-RFP, co oznaczało, że komórki Nr4a1-GFP⁺ były aktywnie przyciągane do mikrośrodowiska nowotworu płuc. Dzięki mikroskopii przyżyciowej stwierdziliśmy, że w ciągu 4 godzin po wstrzyknięciu guza, większość monocytów Nr4a1-GFP⁺ zmniejszyła prędkość ruchu w naczyniach krwionośnych z ok. 10 μm/min do blisko 7 μm/min, a po 24 godzinach komórki te praktycznie nie poruszały się w pobliżu komórek nowotworowych. Dodatkowe analizy wykazały, że zatrzymywanie się monocytów Nr4a1-GFP⁺ było zależne od ich receptora CX3CR1 i jego liganda CX3CL1 na komórkach nabłonka naczyń krwionośnych, którego ekspresja wzrastała pod wpływem osadzających się w kapilarach komórek nowotworowych. W celu potwierdzenia bezpośredniej roli patrolujących monocytów w hamowaniu metastaz płucnych, komórki te zostały przeniesione do myszy z delecją białka Nr4a1. Wykazano, że przerzuty uległy znacznemu zahamowaniu, ale tylko w sytuacji, gdy patrolujące monocyty podano przed komórkami nowotworowymi. Transfer patrolujących monocytów 24 godziny po wstrzyknięciu komórek guza nie hamował przerzutów nowotworowych, co sugerowało, że monocyty te muszą być obecne i aktywne w układzie naczyniowym, aby zapobiec wczesnym etapom metastaz. Badania mikroskopowe pokazały również, że patrolujące monocyty miały zdolność do fagocytozy komórek nowotworowych lub ich resztek. Po 24 godzinach od podania komórek LLC-RFP znajdowano w płucach komórki Nr4a1-GFP⁺ zawierające duże

Autoreferat

ilości materiału pochodzenia nowotworowego. Z uwagi na to, że nie udało udowodnić bezpośredniego efektu cytotoksycznego patrolujących monocytów wobec metastatycznych guzów, kolejne eksperymenty wykazały, że monocyty te wpływają na przyciąganie komórek NK, mających zdolność zabijania komórek rakowych.

Podsumowując, analizy mikroskopowe, za które odpowiadałem i nadzorowałem, w dużym stopniu wspólnie z innymi technikami dowiodły, że patrolujące monocyty przyczyniają się do odporności przeciwnowotworowej poprzez monitorowanie stanu naczyń krwionośnych i rekrutowanie cytotoksycznych komórek NK do miejsc powstawania metastaz. Dzięki tej pracy wskazano nowe, wcześniej niezidentyfikowane cele dla immunoterapii nowotworów.

Publikacja 6: Shaked I, Hanna RN, Shaked H, **Chodaczek G**, Nowyhed HN, Tweet G, Tacke R, Basat AB, Mikulski Z, Togher S, Miller J, Blatchley A, Salek-Ardakani S, Darvas M, Kaikkonen MU, Thomas GD, Lai-Wing-Sun S, Rezk A, Bar-Or A, Glass CK, Bandukwala H, Hedrick CC. (2015) Transcription factor Nr4a1 couples sympathetic and inflammatory cues in CNS-recruited macrophages to limit neuroinflammation. *Nat Immunol.*; 16(12):1228-34.

Praca ta stanowi kolejny przykład współpracy z prof. Hedrick i zastosowania techniki obrazowania przyżyciowego w badaniach nad rolą białka Nr4a1, tym razem w mysim modelu stwardnienia rozsianego (ang. *experimental autoimmune encephalitis*, EAE). W pracy zaangażowanych było wiele zespołów badawczych i różnorodne techniki (m.in. mikroskopia przyżyciowa *in vivo*), dzięki którym kompleksowo wykazano, że Nr4a1 reguluje produkcję norepinefryny w makrofagach poprzez kompleks białkowy CoREST, który hamuje promotor hydroksylazy tyrozynowej, enzymu biorącego udział w syntezie katecholamin. Zmniejszenie wytwarzania norepinefryny ograniczało infiltrację prozapalnych leukocytów do ośrodkowego układu nerwowego i hamowało objawy choroby. Model EAE polega na wprowadzeniu do organizmu biorcy autoreaktywnych limfocytów T CD4⁺ (2D2) z transgenicznym receptorem TCR, swoistym wobec glikoproteiny osłonki mielinowej tkanki nerwowej. Aktywacja komórek 2D2 uruchamia proces niszczenia komórek nerwowych i prowadzi do porażenia, jak w stwardnieniu rozsianym. Do badań wykorzystano myszy Nr4a1-GFP, którym podano aktywowane limfocyty 2D2. Po 7 dniach od indukcji choroby w rdzeniu kręgowym stwierdzono mikroskopowo obecność dużej ilości komórek wytwarzających GFP, które po analizie cytometrycznej zidentyfikowano głównie jako naciekające makrofagi. W celu potwierdzenia roli Nr4a1 w rozwoju choroby, kolejne eksperymenty wykonano na myszach reporterowych CX3CR1-GFP typu dzikiego oraz z delecją białka Nr4a1. Komórki mikrogleju w obu szczepach wytwarzają GFP, co pozwalało na analizy ich morfologii podczas rozwoju choroby. Z kolei, komórki 2D2 były monitorowane *in vivo* dzięki ekspresji fluorescencyjnego białka DsRed. Za pomocą mikroskopii przyżyciowej na operacyjnie odsłoniętym i unieruchomionym rdzeniu kręgowym pokazałem, że 4 dni po transferze komórek 2D2 nie było jeszcze różnic pod względem ilości autoreaktywnych limfocytów infiltrujących rdzeń. Można było zaobserwować tylko pojedyncze komórki 2D2 w obrębie tkanki nerwowej, pośród komórek mikrogleja o charakterystycznym dendrytycznym kształcie, wynikającym z dużej ilości wypustek cytoplazmatycznych. W zarejestrowanych przyżyciowo filmach

Autoreferat

widoczne są ruchy dendrytów, którymi komórki mikrogleja próbują środowisko w celu jego monitorowania. Sytuacja zmieniła się diametralnie w 7 dniu, kiedy to w rdzeniu kręgowym pojawił się masywny naciek komórek 2D2, z tą różnicą, że w szczepie dzikim komórki gromadziły się w pobliżu żyły biegnącej wzdłuż rdzenia, natomiast u myszy z delecją Nr4a1 autoreaktywne limfocyty w pełni spenetrowały rdzeń kręgowy. Część komórek aktywnie przemieszczała się w tkance nerwowej ruchem ameboidalnym, natomiast wiele komórek miało kulisty kształt i nie poruszało się, co sugerowało lokalne oddziaływania z osłonką mielinową włókien neuronalnych, prowadzące do ich niszczenia. Miało to również swoje odzwierciedlenie w zmianie morfologii mikrogleja – komórki te pod wpływem infiltracji komórek 2D2 straciły swoją dendrytyczność, zrobiły się kuliste i nabrziałe, co jest dowodem ich aktywacji podczas stanu zapalnego. Przyżyciowe nagrania również potwierdzały wycofanie i brak aktywności dendrytów.

Badania mikroskopowe będące częścią tej pracy pozwoliły zwalidować model i potwierdzić rolę białka Nr4a1 w przeciwdziałaniu rozwojowi choroby. Praca ta otwiera nowe możliwości terapii stwardnienia rozsianego poprzez manipulowanie ilością lub aktywnością Nr4a1 w celu regulacji wytwarzania norepinefryny i cytokin zapalnych przez makrofagi.

Publikacja 7: Mikołajewicz K, Chodaczek G. (2019) Going deeper: three-dimensional study of $\gamma\delta$ T cells in mouse reproductive tract using tissue clearing methods. *Immunol Cell Biol.*; 97(1):104-111.

Celem tej pracy była wizualizacja limfocytów T $\gamma\delta$ zasiedlających żeński układ rozrodczy. Przyjmuje się, że komórki te, podobnie do ich odpowiedników w innych nabłonkach (skóra, jelita) regulują homeostazę tkanki, którą zasiedlają. Ich biologia i funkcje nadal jednak pozostają w dużej mierze niezbadane. Sugeruje się, że odgrywają one rolę w mechanizmach kontrolujących proliferację komórek epitelialnych i w odpowiedzi przeciwvirusowej. Ich znaczenie w biologii nabłonków było badane z wykorzystaniem myszy z delecją łańcucha delta (*Tcrd*^{-/-}), w których komórki T $\gamma\delta$ nie powstają. Myszy te mają szereg defektów w funkcjonowaniu nabłonków, takich jak częstsza karcynogeneza, zaburzenia gojenia ran czy zwiększona przepuszczalność barier nabłonkowych. W porównaniu do poliklonalnych komórek T $\alpha\beta$, limfocyty T $\gamma\delta$ posiadają oligoklonalne receptory TCR o ograniczonym repertuarze zależnym od miejsca zasiedlenia. W naskórku występują prawie wyłącznie komórki z heterodimerem V γ 5-V δ 1 (nomenklatura wg Tonegawa), podczas gdy nabłonek układu rozrodczego zasiedlają limfocyty T $\gamma\delta$ z łańcuchami V γ 6-V δ 1. W odróżnieniu od naskórka, nabłonek rozrodczy podlega regulacji przez hormony płciowe, zmieniając swoją grubość w zależności od fazy cyklu. Jak dotąd nie było wiadomo, jak wygląda dystrybucja tkankowa rozrodczych limfocytów T $\gamma\delta$ i jak wpływa na nie cykl płciowy.

W badaniach mikroskopowych wykorzystano dwie techniki oczyszczania optycznego tkanek opracowane do obrazowania grubych tkanek lub całych organów (np. mózg): ScaleS i CUBIC. Obie metody polegają na stosowaniu roztworów hiperhydratujących. ScaleS jest oparty na alkoholu cukrowym - sorbitolu, który zapewnia stabilną konserwację tkanek do

Autoreferat

znakowania immunochemicznego bez usuwania lipidów. CUBIC, z drugiej strony, wykorzystuje mocznik i detergenty w celu usunięcia lipidów i wyrównania współczynnika refrakcji w tkance. Oczyszczanie przeprowadzono na tkankach z myszy reporterowych Tcrd-H2BeGFP, w których GFP ulega jądrowej ekspresji swoiście w komórkach T $\gamma\delta$. Obrazowanie prowadzono od strony apikalnej nabłonka, skierowanej do światła pochwy. Jądra GFP⁺ komórek T $\gamma\delta$ były obecne głównie w komórkach nabłonka powyżej zrębu bogatego w kolagen, wizualizowanego za pomocą generacji drugiej harmonicznej. W próbkach kontrolnych, zamocowanych w roztworze ProlongGold, opartym na glicerolu, sygnał GFP był widoczny do głębokości 100 μm , podczas gdy w pochwach oczyszczonych optycznie metodami ScaleS i CUBIC mogliśmy nadal wykrywać go na głębokości 200 μm . Intensywność GFP była wyższa w pochwach oczyszczonych w ScaleS w porównaniu z CUBIC. Następnie, aby lepiej zwizualizować kontekst tkankowy dla komórek T $\gamma\delta$, spróbowaliśmy wybarwić cytoszkielec oraz lamininę 5 - białko błony podstawnej nabłonka. W tym celu wykorzystano zmodyfikowane protokoły CUBIC i ScaleS (AbScale) kompatybilne z immunofluorescencją. Barwienie cytoszkieletu za pomocą falloidyny nie przyniosło pozytywnych rezultatów, natomiast po zastosowaniu metody AbScale sygnał GFP został utracony. Tylko protokół CUBIC pozwolił na barwienie lamininy przy zachowaniu GFP, co umożliwiło określenie dystrybucji komórek GFP⁺ w różnych przedziałach ściany pochwy.

Aby odróżnić skórne limfocyty T $\gamma\delta$ od pochwowych przeprowadziliśmy podwójne barwienie immunofluorescencyjne na receptor TCR $\gamma\delta$ i łańcuch V γ 5, występujący tylko w tej pierwszej populacji. Oczyszczanie tkanki w CUBIC uniemożliwiło tę analizę, ponieważ okazało się, że TCR $\gamma\delta$ praktycznie przestał być wykrywalny, pomimo pozytywnych wyników przy pomiarze cytometrycznym wyizolowanych komórek ze ściany pochwy. Podejrzewając, że wysokie stężenie detergentu Triton X-100, zawarte w roztworze CUBIC, usuwa TCR, barwienia wykonano na tkankach nieoczyszczanych i dopiero tą metodą, przy ograniczeniu obrazowania do 100 μm w głąb ściany pochwy, wykazano obecność dwóch oddzielnych populacji komórek T $\gamma\delta$. Naskórkowe limfocyty T $\gamma\delta$ występowały tylko przy otwarciu pochwy, natomiast w miejscu ich zanikania, w pobliżu błony podstawnej pojawiały się komórki z TCR $\gamma\delta$ bez łańcucha V γ 5; miały one jednak ok. 50-krotnie niższą ekspresję TCR.

Do oceny wpływu hormonów płciowych na dystrybucję komórek T $\gamma\delta$, myszom podaliśmy estrogen, odpowiedzialny za wystąpienie fazy estrus, w której komórki nabłonka proliferują, różnicują się i ulegają rogowaceni, oraz medroksyprogesteron, który indukuje fazę diestrus, podczas której błona śluzowa pochwy, po zrzuceniu zewnętrznej warstwy rogowej, staje się bardzo cienka, o grubości w przybliżeniu od trzech do siedmiu komórek. Analiza mikroskopowa pochwy oczyszczonych metodą CUBIC wykazała, że podczas fazy diestrus liczba limfocytów T $\gamma\delta$ w ścianie pochwy była prawie trzykrotnie większa w porównaniu do fazy estrus. Wzrost ten obserwowano w obu przedziałach pochwowych (nabłonek i podścielisko), a stosunek liczby komórek w nabłonku do liczby komórek w podścielisku pozostawał stały i wynosił ok. 3: 1, niezależnie od fazy cyklu. Ponadto, po zbadaniu dokładnej lokalizacji komórek T $\gamma\delta$ w nabłonku w obu fazach cyklu za pomocą

Autoreferat

zaawansowanych analiz obrazów mikroskopowych, stwierdziliśmy, że w diestrusie limfocyty były obecne w większej odległości od kolagenu i błony podstawnej, i znajdowały się w górnych warstwach nabłonka, pomimo mniejszej ilości warstw i utraty zrogowaciałych komórek. Mogło to sugerować ich aktywną migrację w kierunku światła pochwy w celu lepszego monitorowania stanu nabłonka.

Wyniki tej publikacji pokazały, że komórki T $\gamma\delta$ wyczuwają zmiany w nabłonku wywołane przez hormony płciowe, zmieniając swoją liczbę i lokalizację. Opracowana w tej pracy metodologia wizualizacji pochwojących limfocytów T $\gamma\delta$ posłuży przede wszystkim następnym badaniom wyjaśniającym ich funkcje w różnych stanach fizjologicznych nabłonka pochwy (np. infekcje wirusowe lub grzybicze) oraz pozwoli na badania porównawcze między różnymi szczepami myszy o zmienionej budowie kompleksu TCR, która może determinować dystrybucję komórek T $\gamma\delta$.

Podsumowanie

W pracach tworzących ten cykl zaprezentowałem różne sposoby wizualizacji mikroskopowej komórek układu odpornościowego, skupiając się również na analizie ich dystrybucji, oddziaływań międzykomórkowych oraz ruchliwości wraz z dynamiką ziarnistości cytoplazmatycznych. Zależało mi głównie na zobrazowaniu statusu funkcjonalnego immunocytów, zasadne więc było, by obrazowanie przeprowadzać przyżyciowo i jak najwierniej pokazać rzeczywistość zachodzących procesów biologicznych. Moim największym wkładem w rozwój dziedziny mikroskopii było opracowanie nowych metod wizualizacji i analizy danych, które pozwoliły na wyjaśnienie niektórych funkcji słabo przebadanych jak dotąd populacji układu immunologicznego, takich jak limfocyty T $\gamma\delta$ czy zależne od białka Nr4a1 komórki mieloidalne.

d) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych***Analiza dorobku naukowego niewchodzącego w skład osiągnięcia***

Poza pracami wchodzącymi w skład osiągnięcia habilitacyjnego jestem także autorem lub współautorem:

- 34 publikacji naukowych w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC),
- 10 publikacji naukowych w czasopiśmie innych niż znajdujące się w bazie JCR, w tym jednej pracy przeglądowej,
- 19 komunikatów konferencyjnych (krajowych i zagranicznych),
- 4 referatów wygłoszonych na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych.

Liczba punktów MNSiW i Impact Factor uzyskanych za prace niewchodzące w skład osiągnięcia naukowego opisanego w pkt.4ab autoreferatu to:

a) przed doktoratem:

99 pkt. MNiSW; Impact Factor = 11,858

b) po doktoracie:

894 pkt. MNiSW; Impact Factor = 119,339

Jestem kierownikiem dwóch grantów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (SONATA BIS i OPUS).

Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Po ukończeniu studiów magisterskich na Wydziale Farmaceutycznym, Akademii Medycznej we Wrocławiu w 2001 r., rozpocząłem studia doktoranckie w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, w Laboratorium Immunobiologii, kierowanym przez prof. Michała Zimeckiego. Tematem wiodącym tego laboratorium były właściwości immunomodulacyjne laktoferyny, białka obecnego w mleku. W trakcie studiów doktoranckich angażowałem się we wszystkie kierunki badań prowadzonych w tym laboratorium, związane z aktywnością laktoferyny oraz wpływem nowych związków organicznych na układ immunologiczny (we współpracy z Zakładem Chemii Organicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu):

Poniżej przedstawiłem wybrane aspekty mojej pracy:

Moja praca doktorska dotyczyła wpływu kompleksu laktoferyny i monofosforylowanego lipidu A (MPL), izolowanego ze szczepu bakterii *Hafnia alvei*, na indukcję odpowiedzi immunologicznej na modelowe antygeny. Interesowałem się wówczas szczepionkami i możliwością modulacji wzbudzanych reakcji za pomocą adiuwantów, czyli substancji podanych razem z antygenem w trakcie szczepienia, poprawiających efekt immunizacji. Efektem tych zainteresowań była moja praca przeglądowa dotycząca adiuwantów, opublikowana w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. We wcześniejszych pracach mojego promotora – prof. Zimeckiego – wykazano, że laktoferyna nasila odpowiedź typu Th1 na erytrocyty baranie w teście nadwrażliwości typu opóźnionego. Aktywność laktoferyny w tym modelu oznaczała, że białko to potencjalnie mogło być wykorzystane do stymulacji komórkowej odpowiedzi immunologicznej na antygeny pochodzące z takich patogenów, jak prątki gruźlicy, które mogą być skutecznie zwalczane tylko na drodze reakcji z udziałem limfocytów T. Z kolei, MPL izolowany z bakterii *Salmonella minnesota*, był już stosowany jako adiuwant w szczepionkach, indukując odpowiedź Th1 (komórkową) lub mieszaną Th1/Th2, obejmującą również pobudzenie produkcji przeciwciał. Pomysł na nowy, lepszy adiuwant zrodził się wskutek opisanej w literaturze zdolności laktoferyny do wiązania lipidu A. Mając do dyspozycji MPL pochodzący z bakterii *Hafnia alvei*, otrzymany przez prof. Ługowskiego z Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek w IITD, postawiłem hipotezę, że szczepionka zawierająca laktoferynę i MPL pobudzi większą odpowiedź na podany antygen, niż oba składniki oddzielnie. Badania weryfikujące tę tezę stały się przedmiotem mojej pracy doktorskiej. We współpracy z prof. Ługowskim wykazałem, że laktoferyna wiąże MPL tworząc kompleks, co zostało potwierdzone technikami SDS-PAGE i SPR. Skuteczność kompleksu w pobudzeniu humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej analizowałem stosując owalbuminę (białko jaja kurzego) i erytrocyty baranie jako modelowe antygeny. Otrzymane wyniki pokazały, że kompleks znacznie silniej pobudzał produkcję

Autoreferat

swoistych przeciwciał niż oba składniki osobno, stosowane w odpowiednich dawkach. Podobnie, kompleks działał lepiej w modelu nadwrażliwości typu opóźnionego przy podaniu podskórnym owalbuminy. Kompleks wraz z antygenem zemulgowany w niekompletnym adiuwancie Freund'a był równie skuteczny jak pełen adiuwant Freund'a. Kompleks znacząco zwiększył również odpowiedź Th1 na szczepionkę BCG przy doustnym podaniu. Rezultaty tych badań doprowadziły do zgłoszenia patentowego i opublikowania artykułu w czasopiśmie *Medical Microbiology and Immunology*.

Bezpośrednią kontynuacją tych prac były kolejne eksperymenty mające na celu wykazanie efektu terapeutycznego szczepionki zawierającej analizowany kompleks. W modelu infekcji bakteriami *Plesiomonas shigelloides* CNCTC 138/92 dowiodłem, że myszy były lepiej chronione po szczepieniu z kompleksem jako adiuwantem, w porównaniu do pojedynczych jego składników w odpowiednich dawkach. Efekt adiuwantowy opierał się na wzroście antygenowo swoistych przeciwciał IgG, IgG2a i IgG1 w surowicy oraz na bardziej efektywnym usuwaniu bakterii w śledzionie i wątrobie po infekcji. Wyniki tych badań opublikowane zostały w czasopiśmie *Acta Biochimica Polonica*.

W ramach mojej pracy doktorskiej uczestniczyłem również w innych badaniach poświęconych aktywności laktoferyny w różnych modelach. Razem ze współpracownikami z Laboratorium Immunobiologii wykazaliśmy, że białko to podawane doustnie redukowało objawy kliniczne w szurzym modelu stwardnienia rozsianego, co było również potwierdzone histologicznie - obserwowano zmniejszenie liczby i rozmiaru ognisk zapalnych w rdzeniu kręgowym. Ponadto, laktoferyna obniżyła podwyższony chorobowo poziom TNF α i TGF β w surowicy. Wyniki opublikowano w *Journal of Neuroimmunology*. W innym artykule w *Inflammation Research* zademonstrowaliśmy ochronny wpływ laktoferyny podczas sepsy, polegający na regulacji wydzielania cytokin prozapalnych i mobilizacji neutrofilów do krwiobiegu.

Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

W 2005 r., po zakończeniu prac badawczych do rozprawy doktorskiej, dołączyłem do grupy badawczej prof. Istvana Boldogha w University of Texas Medical Branch w Galveston, USA. Projekt, który realizowałem, dotyczył wpływu wolnych rodników generowanych przez uszkodzone mitochondria na reakcje alergiczne i został opisany w moich osiągnięciach habilitacyjnych (**Publikacja 1**).

Po obronie pracy doktorskiej w grudniu 2006 r. i formalnym nadaniu stopnia doktora w lutym 2007 r. rozpocząłem staż podoktorski w laboratorium mikroskopowym kierowanym przez dr. Tomasza Zala w University of Texas MD Anderson Cancer Center w Houston, USA. Od kwietnia 2007 r. do listopada 2011 r. jako post-doc rozwijałem techniki obrazowania przyżyciowego i prowadziłem badania mikroskopowe, koncentrujące się na biologii skórnych limfocytów T $\gamma\delta$ i kontroli immunologicznej mikrośrodowiska guzów metastatycznych w płucach (**Publikacje 2 i 4** ujęte w osiągnięciach habilitacyjnych). Z uwagi na moje doświadczenie w analizach układu immunologicznego skóry nawiązałem współpracę z dr. Schumacherem z The Netherlands Cancer Institute w Amsterdamie, co zaowocowało wspólną pracą w *PNAS*.

Autoreferat

W 2011 r. moje wyniki i umiejętności w dziedzinie mikroskopii zostały docenione przez władze La Jolla Institute for Allergy and Immunology (LIAI), instytutu naukowego położonego w obrębie San Diego w Kalifornii. Dano mi możliwość kierowania tamtejszą pracownią mikroskopową. Moim głównym zadaniem było pomaganie lokalnym naukowcom w planowaniu i przeprowadzaniu badań mikroskopowych. W mojej pracy w LIAI położyłem nacisk na wdrożenie technik mikroskopii przyżyciowej. Badania, które tam prowadziłem, dotyczyły aktywności układu immunologicznego w różnych modelach chorobowych (choroba nowotworowa, stwardnienie rozsiane, miażdżycy, wirusowe modele infekcyjne, cukrzyca typu 1, nieswoiste zapalenie jelit, anemia sierpowata) i w różnych organach (płuca, rdzeń kręgowy, trzustka, jelita, tętnica szyjna, śledziona, krew). Dzięki mojemu zaangażowaniu w wiele mikroskopowych projektów stałem się współautorem kilku prac opublikowanych w renomowanych czasopismach (**Publikacje 5** (*Science*) i **6** (*Nature Immunology*), *Science Immunology*, *Journal of Clinical Investigations*, *Gastroenterology* i *Journal of Virology*).

W 2014 r. przyjąłem propozycję pracy we Wrocławskim Centrum Badań EIT+ (obecnie PORT Polski Ośrodek Rozwoju Technologii) na stanowisku kierownika Laboratorium Mikroskopii Konfokalnej. W 2015 r. rozpocząłem i dalej realizuję dwa projekty badawcze finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursów Opus i Sonata Bis, w ramach których kontynuuję rozpoczęte w Houston badania limfocytów T $\gamma\delta$ w skórze oraz w układzie rozrodczym (**Publikacje 3 i 7** ujęte w osiągnięciach habilitacyjnych). Nawiązałem też ścisłą i bardzo owocną publikacyjnie współpracę dr. Adamem Junką, kierownikiem Laboratorium Mikrobiologii w PORT, z którym prowadzę analizy mikroskopowe celulozy bakteryjnej i biofilmów.

Regularnie współpracuję też z innymi wrocławskimi naukowcami, z którymi publikuję, wnosząc ze swojej strony analizy mikroskopowe. Przykładowo, z prof. Otlewskim z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego badałem procesy internalizacji tworzonych przez jego zespół przeciwciał scFv. Z prof. Langnerem z Katedry Inżynierii Biomedycznej Politechniki Wrocławskiej analizuję dynamikę błon lipidowych w pęcherzykach typu GUV. Dla prof. Ugorskiego z Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu obrazowałem dystrybucję komórkowa białek zależnych od podoplaniny.

Od 2017 r. angażuję się w organizację Dolnośląskiego Festiwalu Nauki na terenie PORT i prowadzę wykład oraz warsztaty dotyczące technik mikroskopowych w celu rozpropagowania wiedzy o tej dziedzinie badań.

Sumaryczne zestawienie całego dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy to:

- a) 51 publikacji, z czego:
 - 12 prac przypada na okres przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora, a 39 po jego uzyskaniu
 - 49 prac to oryginalne prace twórcze, w tym 40 w czasopismach z listy JCR oraz 9 spoza listy JCR,

Autoreferat

- 2 prace to artykuły przeglądowe, jedna z listy JCR
- b) 23 doniesienia i komunikaty na konferencyjnych krajowych i zagranicznych
- c) współautorstwo 1 krajowego zgłoszenia patentowego.

Wartość bibliometryczna dorobku:

- a) punkty MNiSW za publikacje według wykazu czasopism naukowych MNiSW, zgodnie z rokiem ukazania się pracy: 1259
- przed obroną doktoratu: 99
 - po obronie doktoratu: 1160
- b) sumaryczny IF zgodny z rokiem ukazania się prac: 229,162
- przed obroną doktoratu: 11,858
 - po obronie doktoratu: 217,304
- c) Liczba cytowań moich prac (bez autocytowań) według Web of Science (z dnia 13.02.2019): 723
- d) Indeks Hirscha moich prac według Web of Science (z dnia 13.02.2019): 15

22.02.2019

Grzegorz Chodaczek