

Konkurs na stypendium doktoranckie w projekcie badawczym NAWA

Analiza biologii systemów wieloskalowych mechanizmów antybakteryjnej odporności wrodzonej

finansowanym, ze środków Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej. **INSTYTUCJA:**

Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN

MIASTO: Warszawa

STANOWISKO: adiunkt-posdoc

DYSCYPLINA NAUKOWA: Inżynieria biomedyczna, mikrobiologia, immunologia, biologia komórkowa, biologia systemów

DATA OGŁOSZENIA: 3 lipca 2023

TERMIN SKŁADANIA OFERT: 31 lipca 2023

SŁOWA KLUCZOWE: odporność wrodzona, infekcje bakteryjne, makrofagi, *L. monocytogenes*, heterogeniczność odpowiedzi, analizy na poziomie pojedynczych komórek, NF- κ B, mikroskopia przyżyciowa, modelowanie matematyczne

Informacje o projekcie:

Kierownik projektu: dr hab. inż. Paweł Paszek

Okres trwania: 36 miesięcy

Instytucja: Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN, Pracownia Modelowania w Biologii i Medycynie.

Przybliżona data rozpoczęcia: 1 września 2023 (do negocjacji).

Oferujemy wynagrodzenie do wysokości 6000 PLN/miesiąc w zależności od formy zatrudnienia. Doktorant może ubiegać się o dodatkowe fundusze ze szkoły doktorskiej, np. TIB PAN <http://ibib.waw.pl/pl/szkoly-doktorskie/tib-pan>.

CELE PROJEKTU

Głównym celem projektu jest ilościowe zrozumienie mechanizmów koordynacji wrodzonych odpowiedzi immunologicznych na infekcje bakteryjne na poziomie pojedynczych komórek. W przeciwieństwie do poprzednich badań, skupimy się na oddziaływaniach charakteryzowanych poprzez fizjologicznie niskie wielkości infekcji oraz efektu podwyższonej temperatury (gorączki), które powodują niejednorodne i stochastyczne efekty w zakażonej populacji gospodarza. Zbadamy oddziaływania pomiędzy makrofagami układu wrodzonej odporności z bakterią *Listeria monocytogenes*, która powoduje wysoką zachorowalność i śmiertelność u ludzi. Nasze dane pokazują, że oddziaływania między *L. monocytogenes* i makrofagami, kluczowe dla przebiegu ogólnej infekcji, krytycznie zależą od niewielkiej części patogenów, które replikują i rozprzestrzeniają się w populacji komórek gospodarza.

Naszymi głównymi celami są:

- Wyjaśnienie, w jaki sposób dynamiczne odpowiedzi ścieżek NF- κ B/STAT/IRF kodują informacje o zachowaniu bakterii i wyniku infekcji. Używając mikroskopii przyżyciowej, przeanalizujemy odpowiedzi gospodarza w zakażonych komórkach jako funkcję gęstości i

temperatury, i zrozumiemy, w jaki sposób regulują one różne (i pozornie losowe) wyniki oddziaływań gospodarz-patogen.

- Zrozumienie populacyjnych strategii obronnych gospodarza. Zbadamy, w jaki sposób sygnalizacja parakrynną oraz adaptacja na zmiany temperatury koordynują reakcje zapalne na poziomie całej populacji. W szczególności zbadamy rolę sygnalizacji TNF α , IL1 β , IL6 i IFN α/β w tym procesie.
- Ustalenie czy zmienność odpowiedzi gospodarza i patogenu jest współregulowana jako podstawowy mechanizm odpornościowy. Wykorzystamy metody smFISH i immunofluorescencję, aby zmierzyć odpowiedzi makrofagów gospodarza, a także mikroskopie przyżyciową, aby monitorować aktywację regulonu PrfA w *L. monocytogenes* z rozdzielczością pojedynczej bakterii.
- Opracowanie predykcyjnych modeli matematycznych odpowiedzi immunologicznej na *L. monocytogenes* z wykorzystaniem perturbacji genetycznych i chemicznych, w celu manipulacji wyników infekcji.

METODOLOGIA

Aby kompleksowo zrozumieć niejednorodny i dynamiczny charakter infekcji, zastosujemy podejście biologii systemów na poziomie pojedynczych komórek. Wykorzystamy przyżyciową mikroskopię konfokalną do monitorowania aktywacji NF- κ B/STAT/IRF w czasie rzeczywistym wraz z wirulencją regulonu PrfA i zachowaniem *L. monocytogenes*. smFISH i immunofluorescencja posłużą do pomiarów ekspresji genów zależnych w różnych subpopulacjach komórek gospodarza. Stochastyczne i deterministyczne modele matematyczne opisać ilościowo strategię obronę gospodarza i dostarczenia nowych predykcji.

W projekcie użyte zostaną następujące metody badawcze:

- a) obrazowanie mikroskopowe żywych komórek gospodarza i patogenu przy użyciu markerów fluorescencyjnych, umożliwiających obserwację zachowania i genów wirulencji bakterii oraz aktywacji głównych białek układu odpornościowego gospodarza
- b) obrazowanie mikroskopowe utrwalonych komórek, które umożliwią obserwację większej liczby komponentów układu odpornościowego w określonych punktach czasowych (immunofluorescencja oraz smFISH).
- c) analizę białek oraz ekspresji genów i produkcji cytokin zaangażowanych w odpowiedź antywirusową przy pomocy RT-PCR, digital PCR, Western blot, ELISA i innych odpowiednich technik, np. metod CRISPR do tworzenia fluorescencyjnych linii komórkowych.
- d) system mikrofluidyki kropelkowej do przeprowadzania infekcji przy jednoczesnym zastosowaniu technik pomiarowych z punktów a) i b);
- e) modelowanie matematyczne wykorzystujące procesy Markowa do opisanie infekcji bakteryjnych, wewnątrz- i międzykomórkowego przekazywania sygnału, aktywacji komórek gospodarza, obserwacji losu bakterii w heterogennych populacjach komórek. Uwzględnione zostaną efekty przestrzenne dyfuzji cytokin i rozprzestrzeniania się bakterii.

LABORATORIUM

Poszukujemy entuzjastycznych i zmotywowanych naukowców do pracy w nowo powstałym laboratorium immunologii systemów kierowanego przez dr hab. inż. Pawła Paszka (grant OPUS-23 w wysokości 1,9 mln zł z NCN oraz grant Polskie Powroty w wysokości 1,6 mln zł z NAWA <https://nawa.gov.pl/nawa/aktualnosci/nawa-polskie-powroty-nabor-rozstrzygniety>). Wybrani kandydaci stworzą zespół 5 naukowców stosujących interdyscyplinarne metody do badania odpowiedzi immunologicznej na infekcje bakteryjne.

Projekt będzie prowadzony w Laboratorium Modelowania w Biologii i Medycynie (LMBM) IPPT PAN, które zapewnia w pełni wyposażone laboratorium BSL-2, swobodny dostęp do najnowocześniejszej

aparatury mikroskopowej (w tym urządzeń mikroprzepływowych) oraz wiedzy w zakresie modelowania matematycznego (https://pmbm.ippt.pan.pl/web/Main_Page).

Dr Paszek jest z wykształcenia inżynierem (MSc teoria sterowania, Politechnika Śląska, 2001; PhD statystyka, Rice University, 2006; Postdoc w Centre for Cell Imaging, Liverpool, UK, 2006-11), ale od wielu lat stosuje eksperymentalne metody badania regulacji ścieżek sygnałowych układu odpornościowego (<https://research.manchester.ac.uk/en/persons/pawel.paszek/>). Obecnie pracuje na Wydziale Biologii, Medycyny i Zdrowia na Uniwersytecie w Manchesterze w Wielkiej Brytanii, gdzie kieruje laboratorium immunologii systemów (BBSRC David Phillips Fellowship, 2011-2016). W Manchesterze dr Paszek opracował platformy do ilościowego obrazowania odpowiedzi komórkowych i ekspresji genów, włączając pomiary dynamiki odpowiedzi układu immunologicznego i transkrypcji. Jest współautorem manuskryptów w Science, Nature Communications, PNAS, eLife, Cell Systems i Science Signalling. Ostatnio opracował protokoły do ilościowej badania interakcji typu gospodarz-patogen *Listeria monocytogenes*, ważnego bakteryjnego patogenu człowieka. We wrześniu 2023 dr Paszek przenosi się do IPPT PAN.

Wymagania:

Kandydaci będą uczestniczyli w otwartym konkursie.

Stypendysta musi być uczestnikiem studiów doktoranckich lub doktorantem w szkole doktorskiej, np. TIB PAN <http://ibib.waw.pl/pl/szkoly-doktorskie/tib-pan>

PhD position in the research project NAWA

Systems biology analysis of multi-scale innate immune defences against bacterial pathogens

Financed by the National Agency for Academic Exchange (NAWA), Poland

INSTITUTION:	Institute of Fundamental Technological Research (IPPT PAN)
CITY:	Warsaw
POSITION:	PhD student
SCIENTIFIC DISCIPLINE:	Biomedical engineering, microbiology, immunology, cell and molecular biology, systems biology
DATE OF ANNOUNCEMENT:	3 July 2023
DATE OF ANNOUNCEMENT:	31 July 2023
KEY WORDS:	innate immunity, bacterial infections, macrophages, <i>L. monocytogenes</i>, response heterogeneity, single-cell analyses, live-cell microscopy, mathematical modelling

Information about the project and stipend

Principal Investigator: dr hab. inż. Pawel Paszek

Project duration: 36 months

Institution: Institute of Fundamental Technological Research, Polish Academy of Sciences.

We offer up to 6000 PLN/month for 36 months (depending on the type contract of employment). Additional financial support can be obtained from the doctoral school such as TIB PAN <http://ibib.waw.pl/en/doctoral-schools/tib-pan>.

Approximate start date 1st Sept, 2023 (but can be negotiated).

PROJECT OBJECTIVES

The main aim of the project is to quantitatively understand mechanisms involved in the multi-scale coordination of innate immune responses against bacterial pathogens at the single cell level. In contrast to previous studies, we will focus on events occurring at low physiological multiplicities of infection and physiological febrile temperature range, which give rise to heterogeneous and stochastic effects in the infected population. We will study direct interactions between innate immune macrophages and the important food-borne bacteria *Listeria monocytogenes* that causes significant levels of human morbidity and mortality. Our data demonstrate that interactions between *L. monocytogenes* and macrophages, a key event controlling the overall infection critically rely on a small fraction of 'successful' pathogens, which can effectively replicate and spread within the infected host cell population.

Our main objectives are:

- Elucidate how pathogen threats are encoded in dynamical responses of NF- κ B/STAT/IRF systems upon *L. monocytogenes* infection. We will dissect the host signalling responses in infected cells, as a function of density and temperature and understand how they relate to different (and seemingly probabilistic) outcomes of single-cell host-pathogen interactions.
- Understand the population-level host strategies that underpin successful immune response to infection. We will investigate how paracrine signalling in the infected and bystander population and temperature adaptation coordinate the overall population level inflammatory responses. We will specifically investigate role of TNF α , IL1 β , IL6 and IFN α/β signalling in the process.
- Determine whether the host and pathogen variability are co-regulated as a fundamental immune mechanism. We will use image genomics (smFISH) and immunostaining to measure single-cell effector responses in host macrophages as well as monitor activation of the major PrfA regulon in *L. monocytogenes* at the single bacterium resolution.
- Develop predictive mathematical models of innate immune response to *L. monocytogenes* using genetic and chemical perturbations to validate modelling and manipulate infection outcomes.

TECHNIQUES

In this project, we will use systems biology approaches including live-cell imaging, smFISH and mathematical modelling to dissect host-pathogen interactions at the single cell level. Confocal microscopy will be used to monitor the activation of NF- κ B/STAT/IRF in individual host cells in real-time together with *L. monocytogenes* growth and PrfA virulence. These will be combined with multiplex single molecule fluorescent in situ hybridisation (smFISH) and immunostaining to understand target effector responses in different subpopulations of cells. Stochastic and deterministic single cell and agent-based population models of signalling responses to *Lm* will be used to mechanistically dissect host defence strategies and provide experimentally testable predictions. Following methodologies will be used in the project:

- Live-cell confocal imaging using *L. monocytogenes* encoding fluorescent proteins and reporters of PrfA virulence, human and mouse cells (primary as well as immortalized macrophage lines) expressing fluorescently tagged transcription factors and cytokines.
- Immunostaining and smFISH. Simultaneous measurement of regulatory proteins and mRNAs involved in regulation of immune responses in single cells.
- Gene expression, protein analysis and cytokine production in infected cell populations through the use of RT-PCR, digital PCR, Western Blotting, ELISA, generation of reporter lines using molecular cloning and CRISPR, and other relevant techniques.
- Microfluidic systems to culture adherent and suspended cells allowing for their confocal imaging and immunostaining.
- Mathematical modeling employing Markov processes to describe activation of the immune response in heterogeneous cell populations, cellular communication, density and temperature effect, different outcomes of infection (killing, persistence, replication), regulation of bacterial virulence. We will account for spatial aspects of the cytokine diffusion and bacterial spread.

ENVIRONMENT

We are seeking enthusiastic and highly motivated scientists to join a newly established system immunology lab of dr hab. inż. Paweł Paszek (founded via a PLN 2m OPUS-23 grant from NCN and PLN 1.6m Polskie Powroty grant from NAWA, <https://nawa.gov.pl/nawa/aktualnosci/nawa-polskie-powroty-nabor-rozstrzygniety>). Successful candidate will work in a team of 5 scientists using interdisciplinary approaches to study single cell immune responses to bacterial infections.

Project's PI, Dr Paszek is a theoretician by training (M.S in Control Theory, Silesian University of Technology, 2001, PhD in Statistics, Rice University, 2006, PDRA in Centre for Cell Imaging, Liverpool, UK, 2006-11), but for several years he has been using experimental approaches to investigate the regulation of inflammatory signalling networks (<https://research.manchester.ac.uk/en/persons/pawel.paszek/>). He is currently a Senior Lecturer in the Faculty of Biology, Medicine and Health at the University of Manchester UK where he established an experimental systems immunology lab (during his BBSRC David Phillips Fellowship, 2011-2016). In Manchester, Dr Paszek has developed quantitative live-cell imaging and gene expression platforms to study immune cell signalling, incorporating measurements of TF dynamics and transcription. He has co-authored manuscripts in Science, Nature Communications, PNAS, eLife, Cell Systems and Science Signalling, among others. Recently, he has developed protocols for quantitative single-cell approaches to study host-pathogen interactions of the *Listeria monocytogenes*, an important bacterial pathogen of man.

The project will be conducted in the Laboratory of Modelling in Biology and Medicine (PMBM), IPPT PAN, where dr Paszek is relocating. PMBM will provide a fully equipped laboratory, ready access to state-of-the-art microscopy equipment (including microfluidics) as well as mathematical modelling expertise (see https://pmbm.ippt.pan.pl/web/Main_Page).

Requirements

Candidate will be recruited in the open competition.

Candidate must become a 'participant in a doctoral program' or a 'doctoral candidate at a doctoral school', such as TIB PAN <http://ibib.waw.pl/en/doctoral-schools/tib-pan>

We seek candidates having experience and publication record in one or two of the following areas:

1. Immunology, microbiology or molecular cell biology, with basic knowledge in experimental techniques: cell culture, live and fixed-cell confocal microscopy, RT or digital PCR, Western blot, cell sorting, molecular cloning and CRISPR. Experience in other methods planned for the project and described above is desirable.
2. Mathematical and numerical system biology, ordinary and partial differential equations, stochastic processes, programming.

Background in both areas will be considered beneficial.

Required documents:

1. Copy of MSc diploma. Bachelor diplomas may be also included for evaluation.
2. CV containing information about:
 - Publications,
 - Conference presentations,
 - Prizes and stipends,
 - Other information that can help in evaluation, like experience, achievements, and scientific standing of the candidate,
 - Contact details for two references.
3. Motivation letter (1 page).

Please include in your CV the following clause: "I agree to the processing of personal data contained in my job offer for the needs necessary to carry out the recruitment process conducted by IPPT PAN with headquarters in Warsaw, ul. A. Pawińskiego 5B, according to art. 13 para. 1 and 2 of Regulation (EU) 2016/679 of the Parliament and of the Council of 27 April 2016 on the protection of individuals with regard to the processing of personal data and the free movement of such data and the repeal of Directive 95/46 / EC (RODO)."

The documents should be sent till **July 31st, 2023** to konkursy@ippt.pan.pl, with a copy to Project PI, dr Pawel Paszek pawel.paszek@manchester.ac.uk and Department Secretary Ms. Agnieszka Ponarska aponar@ippt.pan.pl. If needed the candidates will be contacted and invited for the interview. The final decisions will be taken before Sept 1st, 2023.