

# AUTOREFERAT

MICHAŁ A. OLSZEWSKI, DVM, PhD

1. **MICHAŁ A. OLSZEWSKI**2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne z podaniem nazwy miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

| Stopień Naukowy / Dyplom  | Instytucja   | Rok Uzyskania | Kierunek studiów   |
|---|--|---------------|--|
| Lekarz Weternarii:<br>Dyplom ukończenia studiów magisterskich dziennych | Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Weterynaryjny w Warszawie                 | 1988          | Medycyna Weterynaryjna                                     |
| Doctor of Philosophy (Doktor Nauk)                                      | Michigan State University, College of Veterinary Medicine<br>East Lansing, Michigan, USA | 1997          | Nauki Biologiczne/Weterynaryjne<br>Fizjologia/Farmakologia |

Tytuł rozprawy doktorskiej:

**“Inflammatory Mediators, Activated Neutrophils and Bronchospasm in Equine Small Airways: Implications for Inflammation in the Development of Recurrent Airway Obstruction”**

Promotor: Prof. dr N. Edward Robinson,

3. **Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych/artystycznych**

| Czas zatrudnienia | Instytucja naukowa   | Stanowisko Funkcja                  |
|-------------------|--|-------------------------------------|
| 1988-1993         | Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Oddział Chorób Wewnętrznych, Wydział Weterynaryjny w Warszawie  | Asystent                            |
| 1993-1998         | Michigan State University, College of Veterinary Medicine<br>East Lansing, Michigan, USA   | Research Associate (Doktorant)      |
| 1998-2002         | University of Michigan Medical School, Department of Internal Medicine, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine<br>Ann Arbor, Michigan, USA | Postdoctoral Fellow (Adiunkt)       |
| 1999-obecnie      | Rządowy Serwis Badawczy, Department of Veterans' Affairs<br>Ann Arbor Health System, Ann Arbor Michigan, USA   | Research Biologist (Biolog)         |
| 2002-2007         | University of Michigan Medical School, Department of Internal Medicine, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine<br>Ann Arbor, Michigan, USA | Research Investigator (St. Adiunkt) |
| 2007-2015         | University of Michigan Medical School, Department of Internal Medicine, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine<br>Ann Arbor, Michigan, USA | Assistant Professor                 |
| 2015-obecnie      | University of Michigan Medical School, Department of Internal Medicine, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine<br>Ann Arbor, Michigan, USA | Associate Professor                 |

**4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikające go z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

**„Analiza wybranych mechanizmów interakcji oportunistycznego grzyba *Cryptococcus neoformans* z systemem odpornościowym”**

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Qiu Y, Davis MJ, Dayrit J, Hadd ZD, Meister DL, Osterholzer JJ, Williamson PR, Olszewski MA. Immune modulation mediated by cryptococcal laccase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice. *PLoS ONE* 7(10): e47853. doi:10.1371/journal.pone.0047853, 2012 IF<sup>1</sup>: 4.092; MNiSW<sup>2</sup>: **40**; liczba cytowań<sup>3</sup>: **23**
2. Eastman AJ, He X, Qiu, Y, Davis MJ, Vedula P, LyonsDM, ParkYD; Hardison SE; Malachowski A; Wormley FL; Williamson PR, Olszewski MA. Cryptococcal Heat Shock Protein 70 Homolog Ssa1 Contributes to Pulmonary Expansion of *Cryptococcus neoformans* during the Afferent Phase of the Immune Response by Promoting Macrophage M2 Polarization. *J Immunol.* 194:5999-6010, 2015 IF<sup>1</sup>: 4.922; MNiSW<sup>2</sup>: **35**; liczba cytowań<sup>3</sup>: **7**
3. Qiu Y, Dayrit JK, Davis MJ, Carolan J, Osterholzer JJ, Curtis JL, Olszewski, MA. Scavenger receptor A modulates the immune response to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol.* 191(1): 238-248, 2013 IF<sup>1</sup>: 5.362; MNiSW<sup>2</sup>: **35**; liczba cytowań<sup>3</sup>: **16**
4. Davis MJ, Tsang T, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, Olszewski, MA. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio* 4(3)/mBio. 00264-13, 2013 IF<sup>1</sup>: 6.875; MNiSW<sup>2</sup>: 40; liczba cytowań<sup>3</sup>: **92**
5. Davis MJ, Eastman AJ, Qiu Y, Gregorka B, Kozel TR, Osterholzer JJ, Curtis JL, Swanson J, Olszewski, MA. *Cryptococcus neoformans*-induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence. *J. Immunol.* 194: 2219-2231, 2015 IF<sup>1</sup>: 4.922; MNiSW<sup>2</sup>: 35; liczba cytowań<sup>3</sup>: **12**

---

<sup>1</sup> Wartość współczynnika wpływu (IF) zgodnie z rokiem opublikowania.

<sup>2</sup> Liczba punktów według polskiego systemu punktacji czasopism, zgodnie z rokiem opublikowania.

<sup>3</sup> Liczba cytowań (z uwzględnieniem autocytowań), według bazy Scopus, stan z dn. 25.05. 2017 r.

c) omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

**Kryptokoza** jest chorobą zakaźną wywołaną przez oportunistycznego drożdżaka - *Cryptococcus neoformans* stwierdzaną u blisko miliona pacjentów rocznie. Ze względu na zdolność rozsiewu do centralnego systemu nerwowego (CNS), tzw. CNS-tropizm kryptokokoza jest jedną z głównych przyczyn śmiertelności poprzez zakażenie CNS w skali światowej. Badania nad tym wciąż

niewystarczająco poznanym drobnoustrojem są niezmiernie ważne, ponieważ atakuje on osoby z różnymi niedoborami systemu odpornościowego, szczególnie pacjentów z AIDS i biorców transplantowanych organów w stanie immunosupresji, u których choroba jest w dużej mierze śmiertelna lub też pozostawia po sobie trwałe konsekwencje<sup>4</sup>. Coraz częściej jednak, zwłaszcza w krajach rozwiniętych, kryptokokoza pojawia się u pacjentów bez widocznego defektu w systemie odpornościowym.

Kolejnym krytycznym elementem kryptokokozy jest wymaganie długotrwałego leczenia wysoce toksycznymi lekami przeciwgrzybiczymi, a pomimo leczenia, infekcja ta jest śmiertelna u ponad 60% zdiagnozowanych pacjentów<sup>4</sup>. U większości zdrowych osób, kryptokok nie wywołuje jednak śmiertelnego zakażenia. Ponieważ sprawny sytem odpornościowy jest w stanie przewyciężyć to zakażenie i większość osób jest w stanie utworzyć skuteczną odporność.

Dlatego szczegółowe poznanie mechanizmów działania czynników zjadliwości na system odpornościowy oraz rozpoznanie które elementy odporności są konieczne lub sprzyjające eliminacji kryptokoka, a które są zbędne lub wręcz niekorzystne jest niezmiernie ważne dla:

- 1) zrozumienia problemów które predysponują poszczególnych pacjentów do zachorowania na kryptokozę (zwłaszcza tych bez HIV), by w miarę możliwości przywrócić ich właściwą funkcję
- 2) znalezienia biomarkerów, które pozwolą na właściwą prognozę i dobranie optymalnego leczenia
- 3) znalezienia możliwości usprawnienia obecnie niezadawalających terapii poprzez:
  - a) wzmocnienie naturalnych mechanizmów obronnych systemu odpornościowego
  - b) neutralizację najważniejszych czynników zjadliwości kryptokoka

W związku z tym moje badania skoncentrowały się na dwóch grupach powiązanych ze sobą zagadnień naukowych dotyczących mechanizmów interakcji oportunistycznego drożdżaka *Cryptococcus neoformans* z systemem odpornościowym:

- a) **wpływ czynników zjadliwości na różne aspekty odpowiedzi odpornościowej**
- b) **roli wzajemnych oddziaływań makrofagów i *C. neoformans* na przebieg infekcji**

---

<sup>4</sup>Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. *Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/aids. AIDS 23(4), 525–530 (2009).*

## **Rola kryptokokowych czynników zjadliwości**

### **Mechanizm oddziaływania kryptokokowej lakazy na system odpornościowy:**

Lakaza jest enzymem z rodziny oksydoreduktaz (oksydaza difenolowa) występującym w organizmach roślin, grzybów i innych drobnoustrojów. Ze względu na to, że lakaza nie występuje w organizmie człowieka a jednocześnie stanowi jeden z ważnych czynników zjadliwości kryptokoka mającym szczególny związek z rozsiewem do CNS, jest ona obiektem badań nastawionych na zdefiniowanie nowych strategii terapeutycznych przeciw *C. neoformans*. Nasze badania miały na celu określenie wpływu lakazy na system odpornościowy.

Eksperymentalne zakażenia u myszy z zastosowaniem zjadliwego szczepu dzikiego H99, charakteryzującego się gwałtownym rozsiewem do CNS oraz jego mutantu z usuniętym genem lakazy (*LAC1*) wykazały, że lakaza w znacznym zakresie zaburzyła rozwój miejscowej (płuca) i ogólnej odpowiedzi odpornościowej. Lakaza działała nie tylko jako supresor napływu limfocytów T (ważnych dla zwalczania kryptokoka) i ich pożądanej polaryzacji Th1 i Th17, ale również jako faktor wzmagający rozwój nieporządanej polaryzacji Th2 i przez to alternatywnej aktywacji (M2) makrofagów. Stosując serię transferów limfocytów T od zakażonych myszy które rozwinęły odporność anty-kryptokową przy obecności lub pod nieobecność lakazy udowodniliśmy, że modulacja funkcji limfocytów T poprzez lakazę, poważnie wzmacnia CNS-tropizm kryptokoka.

W podsumowaniu, nasze badania jako pierwsze zademonstrowały że lakaza wywołuje, silne zaburzenie równowagi pomiędzy trzema typami konwencjonalnej swoistej odpowiedzi komórkowej (Th1, Th2 i Th17) u zakażonych myszy, wspierając niekorzystną Th2, która w konsekwencji silnie promuje rozsiew kryptokoka z płuc do CNS. Drastyczne różnice w poziomie rozsiewu u biorców przetransferowanych limfocytów T, dodatkowo wykazały jak silny jest związek oddziaływania lakazy na system odpornościowym z wyjątkowym CNS-tropizmem drożdźowca *C. neoformans*. Poza bezpośrednim wpływem lakazy na rozrost kryptokoka w mózgu zainfekowanych osobników, nasze badania zidentyfikowały nowy immunomodulacyjny mechanizm, poprzez który lakaza wzmacnia wzrost kryptokoka w płucach jego rozsiew do CNS. Odkrycie tej wielofunkcyjnej roli lakazy w kryptokokowej zjadliwości wskazują, że zablokowanie lub neutralizacja lakazy powinna być jednym z głównych celów w rozwoju strategii terapeutycznych.

### **Mechanizm oddziaływania kryptokowego białka szoku cieplnego Ssa1 na system odpornościowy:**

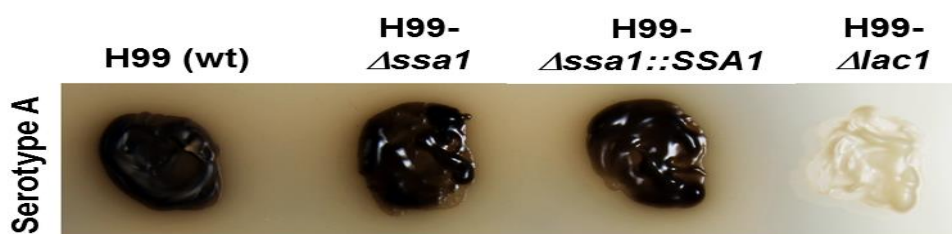
Ponieważ lakaza odgrywa tak znaczącą rolę w zjadliwości *C. neoformans* nasze zainteresowania podążyły w kierunku poznania mechanizmów działania innego czynnika zjadliwości, funkcjonalnie powiązanego z lakazą według wcześniejszych doniesień<sup>5</sup>. Ten czynnik to Ssa1, jedno białek szoku cieplnego, homolog powszechnie występującego w świecie żyjących organizmów Hsp70. Rolę Ssa1 w zjadliwości kryptokoka określono początkowo na podstawie wyników eksperymentalnych infekcji u myszy, stosując szczep macierzysty rzadziej spotykanego serotypu D oraz jego mutantu  $\Delta$ ssa1<sup>5</sup>. Badania te wykazały że czynnik Ssa1 działa jako induktor (czynnik transkrypcyjny) genu lakazy. Jako typowe białko szoku cieplnego, Ssa1 pełni wielorakie funkcje komórkowe, ale także eksportowany jest do kapsuły zewnętrznej kryptokoka, gdzie oddziałuje z różnymi czynnikami systemu odpornościowego. W związku z tym podejrzewaliśmy, że Ssa1 może dodatkowo wpływać na rozwój odporności w sposób niezależny od lakazy.

---

<sup>5</sup>Zhang, S., M. Hacham, J. Panepinto, G. Hu, S. Shin, X. Zhu, and P. R. Williamson. *The Hsp70 member, Ssa1, acts as a DNA-binding transcriptional co-activator of laccase in Cryptococcus neoformans*. Mol.Microbiol. 62: 1090–1101 (2006)

W celach tych badań, we współpracy z Prof. Williamsonem skonstruowaliśmy szczep  $\Delta ssa1$  w oparciu o szczep macierzysty H99 (najbardziej rozpowszechnionego serotypu A), oraz szczep komplementarny z przywróconym genem *Ssa1*. Te szczepy zostały wykorzystane w modelu infekcji dotchawiczej u myszy w celu porównania kontroli wzrostu mikroorganizmu w płucach i w CNS, przeżywalności zakażonych myszy oraz głównych parametrów odpowiedzi odpornościowej.

Zgodnie z naszą hipotezą usunięcie genu *SSA1* zaowocowało opóźnioną śmiertelnością zakażonych myszy, zmniejszonym rozrostem *C. neoformans* w płucach i poprawą parametrów polaryzacji makrofagów z M2 na M1 we wczesnej fazie infekcji. Te zmiany w aktywacji makrofagów wyizolowanych z płuc myszy zakażonych  $\Delta ssa1$  objęły: obniżenie ekspresji arginazy (*Arg1*), receptora CD206, galektyny-3 i czynnika Fizz1 i zwiększeniae ekspresji syntetazy tlenu azotu (*iNOS*), receptora CD80 i czynnika zgodności tkankowej (MHC II). Jednakże przedłużenie żywotności zakażonych myszy było stosunkowo niewielkie, a różnice w liczbie drożdżaków w płucach, poziomie ekspresji cytokin i ekspresji znaczników polaryzacji M1 i M2 zatarty się wraz z rozwojem odporności swoistej t.j. po 14-ym dniu zakażenia. Te wyniki były zupełnie odmienne od wyników uzyskanych w badaniach nad lakazą, szczególnie w przedziale czasowym wystąpienia głównego efektu. Co więcej u myszy zakażonych  $\Delta ssa1$ , zaobserwowaliśmy infekcję CNS motywując dalszą analizę szczepu  $\Delta ssa1$  w serotypie A. Badania w naszym szczepie  $\Delta ssa1$  nie wykazały zmian w aktywności lakazy wykryty poprzez produkcję jej głównego produktu, melaniny (fot. poniżej), pomimo potwierdzonego braku ekspresji *Ssa1*, wskazując na to, że szczep H99 nie wymagał białka *Ssa1* do produkcji lakazy.



Ten nieoczekiwany wynik odmiennej funkcji *Ssa1* w indukcji lakazy pomiędzy serotypami D i A, wyjaśnił brak wpływu kryptokokowego *Ssa1* na przebieg odporności swoistej u myszy zakażonych kryptokokiem serotypu A i pozwolił nam na ocenę bezpośredniego wpływu *Ssa1* (niezależnego od ekspresji lakazy) na system odpornościowy. Ten niezależny od lakazy wpływ *Ssa1* ograniczył się do efektu na fazę odporności nieswoistej.

W podsumowaniu, kryptokowy czynnik *Ssa1* odgrywa specyficzną rolę w modulacji odpowiedzi systemu odpornościowego odrębną od wpływu wcześniej opisanej lakazy. Oba czynniki przyczyniają się do rozrostu kryptokoka, jednakże *Ssa1* poprzez ingerencję w fazę odporności nieswoistej a lakaza poprzez modulację odporności swoistej. Pod tym względem oba czynniki odgrywają uzupełniającą się rolę w zjadliwości *C. neoformans*.

Jeżeli chodzi o możliwość zastosowania zdobytej wiedzy do celów terapeutycznych, zneutralizowanie tych dwóch czynników zjadliwości kryptokoka mogłoby teoretycznie zaowocować

usprawnieniem mechanizmów obronnych zakażonych pacjentów, zakładając, że czynniki zjadliwości mają podobny wpływ na system odpornościowy u ludzi, tak jak u myszy. W tym wypadku neutralizacja Ssa1 była by szczególnie ważna u pacjentów zakażonych serotypem A, z głębokim brakiem limfocytów T (np. AIDS), gdzie ze względu na brak odporności swoistej, odporność nieswoista nabiera większego znaczenia. Jednakże neutralizacja lakazy nawet u tych pacjentów przeciwstawiłaby się rozsiewowi *C. neoformans* do mózgu. Poza tym inhibitory lakazy mogłyby odnieść lepszy skutek u pacjentów, u których nie zaobserwowano braku lub przywrócono funkcję limfocytów T, gdzie neutralizacja Ssa1 (za wyjątkiem pacjentów zakażonych serotypem D) nie miałaby już większego znaczenia.

## **Rola wzajemnych oddziaływań makrofagów i kryptokoka na odporność**

### **Rola makrofagowego receptora SRA:**

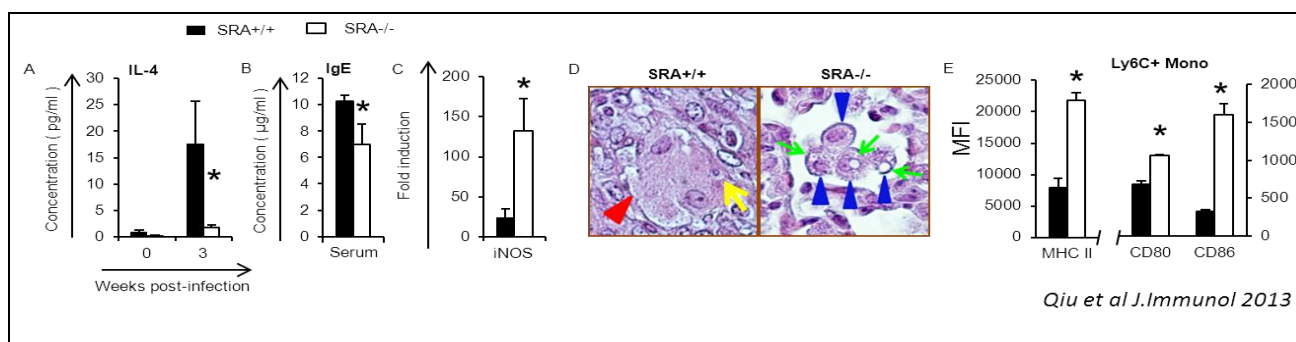
Makrofagi są niezmiernie ważną grupą komórek w opowiedzi odpornościowej na *C. neoformans*, ponieważ w zależności od poziomu aktywacji, mogą niszczyć zakażające je kryptokoki, służąc jako dystalna komórka efektorowa, lub też stawać się rezerwuarem namnażających się drobnoustrojów, przyczyniając się do wzrostu drobnoustroju i rozsiewu zakażenia<sup>6</sup>. By poznać nieznaną jeszcze rolę receptora SRA (scavenger receptor A) zakaziliśmy kryptokokiem myszy typu dzikiego (SRA+/+) i myszy SRA-/-, nie posiadające tego receptora. Zaobserwaliśmy, że kryptokok wykorzystuje SRA do wzmożenia zjadliwości, ponieważ usunięcie SRA spowodowało znacząco dłuższą przeżywalność zakażonych myszy i polepszoną kontrolę organizmu nad rozrostem kryptokoka. Co ciekawe, ekspresja SRA nie wpływała na fagocytozę kryptokoków przez makrofagi, oraz polaryzację M1/M2 w kulturach *in vitro*. Natomiast SRA zaburzał rozwój swoistej odpowiedzi odpornościowej wzmagając nieporządaną polaryzację Th2 (zwiększona ekspresja interleukiny (IL)-4 (wykres A) i IL-10, poziomu IgE w surowicy (wykres B), wiążącą się ze zmianą polaryzacji M1 na M2 makrofagów w zakażonych płucach (wykres C i fot. D). By sprawdzić czy wpływ SRA miał związek z modulacją sygnałów komórek prezentujących antygeny, które wpływają na ukierunkowanie polaryzacji limfocytów T<sup>6</sup> dokonaliśmy wieloparametrowej cytometrii przepływowej.

Zgodnie z naszym przypuszczeniem, obecność SRA wpłynęła na obniżenie cech aktywacji komórek prezentujących antygen (komórek dendrytycznych i ich prekursorów, Ly6C pozytywnych monocytów<sup>7</sup>) zmniejszając ekspresję głównego czynnika zgodności tkankowej (MHC II) i receptorów kostymulacji antygenowej CD80 i CD86 (wykres E).

---

<sup>6</sup>Arora, S., Y. Hernandez, J. R. Erb-Downward, R. A. McDonald, G. B. Toews, and G. B. Huffnagle. *Role of IFN-g in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic broncho-pulmonary mycosis*. J. Immunol. 174: 6346–6356 (2005)

<sup>7</sup>Osterholzer JJ, Chen GH, Olszewski MA, Curtis JL, Huffnagle GB, Toews GB: *Accumulation of CD11b+ lung dendritic cells in response to fungal infection results from the CCR2-mediated recruitment and differentiation of Ly-6Chigh monocytes*. J. Immunol. 183(12): 8044-8053 (2009)



**Ekspresja receptora SRA wzmacnia nieporządane polaryzacje Th2 limfocytów i M2 makrofagów w płucach u myszy zakażonych *C. neoformans*.** Myszy SRA<sup>+/+</sup> i SRA<sup>-/-</sup> zostały zakażone 10<sup>4</sup> komórek *C. neoformans*. Usunięcie receptora SRA doprowadziło do zmniejszenia wzrostu kryptokoka i zmniejszenia elementów niekorzystnej odpowiedzi typu Th2 zaobserwowanego w postaci: A) spadku produkcji IL-4 przez leukocyty płucne; B) obniżenia poziomu przeciwciał IgE w surowicy; C) wzmożenia indukcji genu M1 (iNOS) o znanej aktywności przeciwgrzybiczej w makrofagach i (D) rozwoju morfologicznej charakterystyki M1 makrofagów niszczących kryptoki (niebieskie strzałki). Zaobserwowaliśmy też zwiększoną ekspresję MHC II i receptorów kostymulacji antygenowej CD80 i CD86 przez Ly6C<sup>+</sup> monocyty (E) w zakażonych płucach u myszy SRA<sup>-/-</sup> w porównaniu z myszami SRA<sup>+/+</sup>. \* p < 0.05

Nasilona ekspresja tych czynników zgodnie z naszymi poprzednimi badaniami jest wymagana do prawidłowego rozwoju ochronnej odporności Th1 a ich niedobór prowadzi do Th2.

Choć kryptokokowy czynnik wiążący się z SRA i wywołujący te skutki pozostaje nieznany, nasze badania wykazały, że kryptokokowa lakaza lub jej produkty metaboliczne nie były związane z negatywnym wpływem SRA na układ odpornościowy. Wyżej wymienione efekty SRA były zaobserwowane po zakażeniu myszy i szczepem dzikim H99 i szczepem lac1<sup>-</sup> z usuniętym genem lakazy. W podsumowaniu, nasze badania wykazały, że kryptokok wykorzystuje naturalny receptor SRA żywiciela do wzmożenia zjadliwości, sugerując że interwencja terapeutyczna mająca na celu blokowanie receptora SRA, mogłaby przyczynić się do ulpszonej odpowiedzi odpornościowej u pacjentów z kryptokokozą.

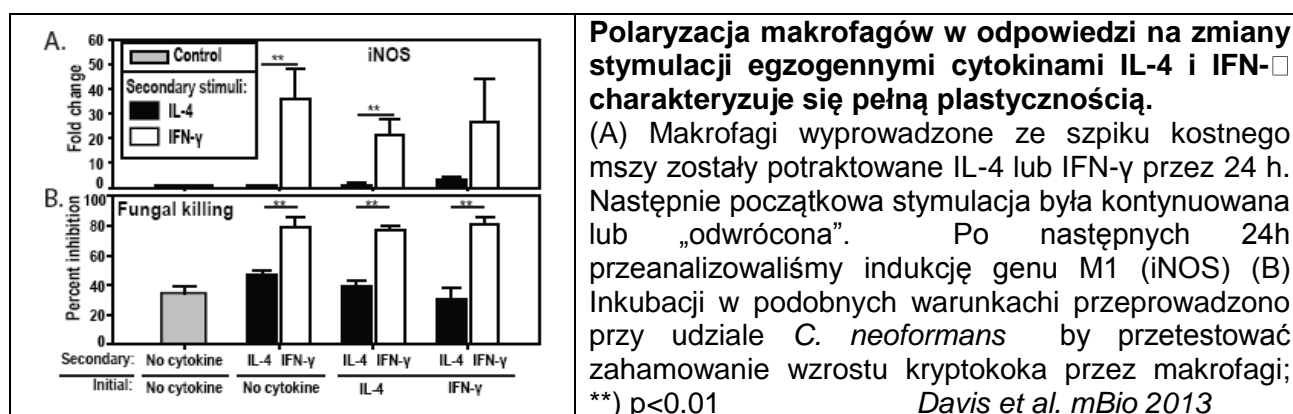
### Plastyczność polaryzacji makrofagów i wpływ czynników zewnętrznych na jej modyfikację:

Nasze wcześniejsze badania wykazały, że stan polaryzacji makrofagów w zakażonych płucach ewoluje w czasie tej długotrwałej infekcji, odzwierciedlając fluktuację poziomu cytokin polaryzujących makrofagi (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 i IL-13)<sup>8</sup>. By rozważyć teoretyczną możliwość zastosowania terapii, która mogłaby odwrócić niekorzystną „alternatywną” polaryzację M2 zastępując ją korzystną „klasyczną” polaryzację M1 przeprowadziliśmy badania nad wpływami „wymiany cytokin” na stan polaryzacji makrofagów. Te badania miały na celu stwierdzenie czy w przeciwieństwie do nieodwracalnie spolaryzowanych limfocytów T, spolaryzowane makrofagi.

<sup>8</sup>Arora, S., M. A. Olszewski, T. M. Tsang, R. A. McDonald, G. B. Toews, and G. B. Huffnagle. *Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun. 79: 1915–1926, (2011)



Nasze badania *in vitro* wykazały, że cytokiny IFN- $\gamma$  i IL-4 były najsilniejszymi czynnikami polaryzacji M1 i M2, bez względu na to, czy makrofagi były stymulowane w obecności czy pod nieobecność kryptokoków. Inkubacja w IFN- $\gamma$  po 24 h spowodowała wyraźne podwyższenie ekspresji markerów M1: iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6 i CD80 na poziomie mRNA i białek. Inkubacja z IL-4 nie wpłynęła na ekspresję tych wskaźników M1, natomiast spowodowała wyraźną indukcję markerów M2: Arg1, YM2, CD206. Wymiana cytokin z IL-4 na IFN- $\gamma$  i odwrotnie pokazała, że makrofagi skrajnie spolaryzowane przez cytokiny do stanu M1 lub M2, po wymianie polaryzujących czynników były w stanie kompletnie odwrócić stan polaryzacji w przeciągu 24 godzin, zgodnie z kierunkiem działania ostatniego z zastosowanych czynników (wykr. A). Te zmiany na poziomie ekspresji głównych genów charakteryzujących profile M1 i M2 przekładały się również na poziom hamowania wzrostu *C. neoformans* przez makrofagi zgodnie ze stanem polaryzacji wywołanym poprzez ostatni z zastosowanych czynników i bez względu na jej pierwotny profil. Makrofagi stymulowane IFN- $\gamma$  skutecznie hamowały wzrost kryptokoków na identycznym poziomie bez względu na to czy były uprzednio niespolaryzowane, spolaryzowane na M1 czy też na M2 (wykr.B).

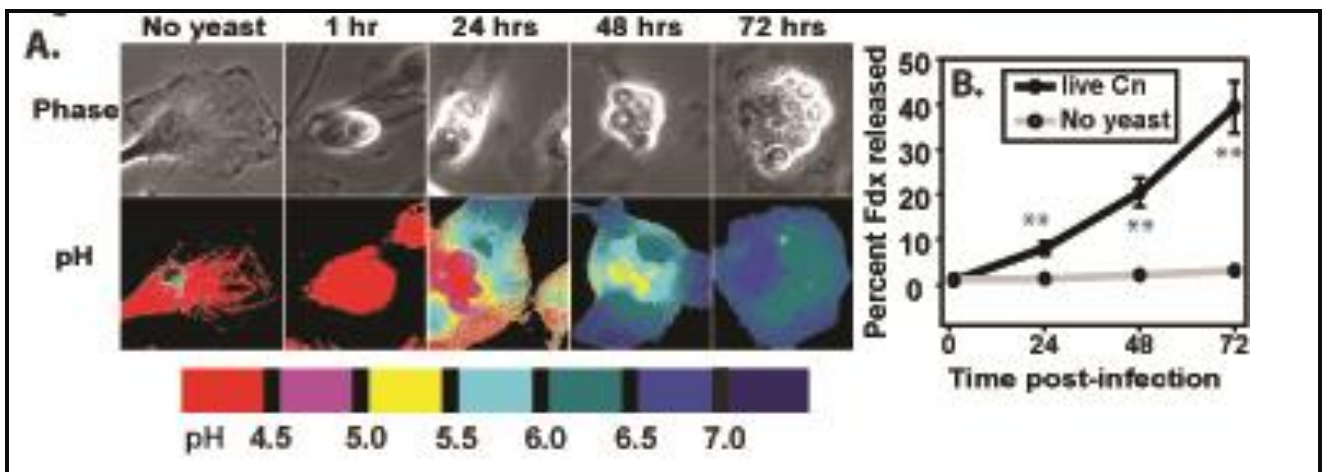


W podsumowaniu nasze badania wykazały, że stymulacja makrofagów czynnikami zewnętrznymi, które sprzyjają polaryzacji M1, może przywrócić makrofagom ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe nawet po okresie niekorzystnej polaryzacji. W związku z tym terapia ukierunkowana na usprawnienie poziomu aktywności makrofagów mogłaby być wykorzystana w późniejszych stadiach kryptokozy. Co więcej środki farmakologiczne stymulujące aktywność makrofagów typu M1, mogłyby być efektywne nawet u pacjentów pozbawionych funkcjonalnych limfocytów T.

### Uszkodzenie lizosomów w makrofagach przez *C. neoformans* i rola polaryzacji makrofagów w zapobieganiu uszkodzenia:

Nasze ostatnie badania skupiły się nad poznaniem wewnątrzkomórkowych mechanizmów przeżywalności kryptokoka w makrofagach. Niespolaryzowane makrofagi „w stanie spoczynku” lub alternatywnej aktywacji M2 zachowują zdolność fagocytozy kryptokoka, aczkolwiek drobnoustrój przeżywa i namnaża się w tych komórkach. Co ciekawe, sfagocytowany kryptokok przemieszcza

się do lizosomu, gdzie teoretycznie powinien być zniszczony przez wysoki poziom zakwaszenia (niskie pH) i aktywność enzymów trawiących skoncentrowanych w lizosomie. Ponieważ niektóre patogeny wewnątrzkomórkowe przeżywają wewnątrz makrofagów dzięki zdolności uszkodzenia lizosomów, przeprowadziliśmy badania mające na celu określenie wpływu sfagocytowanych kryptokoków na zachowanie lizosomów. Badania te zastosowały metodę ratiometrycznej analizy cyfrowych obrazów zainfekowanych makrofagów wykonanych przyżyciowo. Analiza ta pozwoliła nam określić ilościowo wyciek zawartości lizosomów do cytoplazmy i zmiany w odczynie pH w lizosomie zakażonych makrofagów. By dokonać tej analizy, zawartością lizosomów w makrofagach została oznakowana fluorescencyjnym wskaźnikiem FITC-dextran, przyjętym przez makrofagi na drodze pinocytozy. Następnie po zakażeniu makrofagów *C. neoformans* fotografie cyfrowe żywych komórek wykonano stosując zróżnicowane filtry świetlne by określić fluorescencje makrofagów widmie 440nm i 485nm od 1h do 72h po zakażeniu. Nasze wyniki wykazały, że sfagocytowane, żywe kryptokoki uszkadzały lizosomy makrofagów, co powodowało wyciek zawartości lizosomów do cytoplazmy i neutralizację ich kwasowości (fot. A poniżej).



Uszkodzenie to zwiększało się z upływem czasu (wykres B) i było proporcjonalne do liczby wewnątrzkomórkowych kryptokoków. Uszkodzenie wymagało żywotności kryptokoków a jego poziom korelował z ich wewnątrzkomórkowym podziałem. Co więcej, uszkodzenie lizosomów wywołane światłem lasera bezpośrednio przed zakażeniem komórek, potroiło tempo wewnątrzkomórkowego namnażania się kryptokoków w ciągu następnych 24h. By wykazać, że uszkodzenie lizosomów występuje w czasie naturalnej infekcji w płucach, nasz zespół opracował metodę oceny przyżyciowego uszkodzenia makrofagów z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, z użyciem opracowanego przez nas znacznika wykrywającego pH, dostarczonego do płuc myszy w czasie zakażenia fluorescencyjnie oznakowanym kryptokokiem. Tą metodą wykryliśmy natężenie oznak uszkodzenia lizosomów w makrofagach wyplukanych z płuc zakażonych myszy, w komórkach, które zawierały sfagocytowane kryptokoki, ale nie w komórkach wolnych od zakażenia. By określić rolę polaryzacji makrofagów w zapobieganiu uszkodzenia

lizosomów makrofagi zostały spolaryzowane przez inkubację z IFN- $\gamma$  (M1) i IL-4 (M2) i zakażone kryptokokiem. Stymulacja makrofagów IFN- $\gamma$  (polaryzacja M1) znacząco zapobiegła uszkodzeniu lizosomów, równoległe ze zwiększonym wewnątrzkomórkowym zabijaniem kryptokoków przez makrofagi. Tych zmian nie zaobserwowaliśmy w makrofagach potraktowanych IL-4. Nasze wyniki pozwoliły nam wywnioskować, że uszkodzenie lizosomów jest ważną „strategią przyżywania” kryptokoków wewnątrz makrofagów, natomiast klasyczna polaryzacja M1 makrofagów stanowi naturalny mechanizm obronny, który pozwala zapobiec uszkodzeniu lizosomów i zwiększyć grzybobójcze efekty makrofagów.

Wyniki naszej ostatniej serii badań mogą mieć ważne implikacje terapeutyczne sugerując, że zastosowanie leków zwiększających stabilizację lizosomów może być pomocne w leczeniu kryptokokozy innych podobnych chorób z patogenami namnażającymi się wewnątrzkomórkowo. Opracowanie nowej metody do wykrywania przyżyciowego uszkodzenia lizosomów jest również elementem naukowego postępu technologicznego. Metoda ta może zostać szerzej wykorzystana do badań nad innymi patogenami lub do badań innych schorzeń, w których uszkodzenie lizosomów może odgrywać ważną rolę.

#### **Podsumowanie:**

Pomimo dostępnych środków przeciugrzybiczych, kryptokokoza nie może być wyleczona bez aktywnej roli systemu odpornościowego. Stąd bardzo wysoka jest śmiertelność w kryptokozie (ponad 60%), która atakuje często (aczkolwiek nie tylko) osoby z zaburzeniami w systemie odpornościowym. Celem naukowym moich badań było opracowanie mechanizmów wzajemnego oddziaływania kryptokoka i komórek systemu odpornościowego. Dogłębne poznanie tych interakcji przedstawi nowe możliwości interwencji terapeutycznych opartych na: 1) neutralizacji negatywnych wpływów czynników zjadliwości; 2) osłabieniu negatywnych elementów odpowiedzi immunologicznej (Th2 i M2); i 3) wzmaganiu pozytywnych elementów odpowiedzi immunologicznej (Th1, M1), w celu ograniczenia rozprzestrzeniania się kryptokoka do CNS i usprawnienia procesu leczenia w kryptokozie.

Poza możliwością zastosowania tej wiedzy w opracowaniu nowych metod leczenia w kryptokozie, wiele chorobotwórczych drobnoustrojów wykorzystuje podobne mechanizmy zjadliwości, unikania i modulacji systemu odpornościowego dla osiągnięcia pasożytnictwa wewnątrzkomórkowego. Wśród tych patogenów można wymienić bakterie: prątki gruźlicy, legionellę i listerię; pasożyty: toxoplasmę i leishmanię; oraz inne gatunki chorobotwórczych grzybów: histoplasmę i blastomykozę. Nasze wyniki mogą więc w przyszłości znaleźć szersze zastosowanie w zrozumieniu i opracowaniu terapii w chorobach zakaźnych tego typu.

**Przedstawiony cykl prac obejmuje 2 odrębne grupy współzupelniających się zagadnień badawczych, które stanowią przedmiot moich zainteresowań naukowych dotyczących mechanizmów interakcji oportunistycznego drożdżaka *Cryptococcus neoformans* z systemem odpornościowym:**

- 1) Opracowanie mechanizmu działania poszczególnych czynników zjadliwości kryptokoka, w odniesieniu do modulacji swoistych i nieswoistych elementów odpowiedzi odpornościowej z uwzględnieniem:
  - lakazy
  - białka szoku cieplnego Ssa1
- 2) Badanie wzajemnych interakcji pomiędzy kryptokokiem i makrofagami z uwzględnieniem:
  - roli makrofagowego receptora SRA
  - wpływu kryptokoka i głównych cytokin produkowanych w czasie odpowiedzi odpornościowej na stan aktywności makrofagów oraz możliwość jego modyfikacji
  - roli uszkodzenia lizosomów makrofagowych przez *C. neoformans* i możliwości jego zapobiegania

**Badania te przyczyniły się do głębszego zrozumienia patogenezы zakażeń kryptokokowych i wskazania kierunków rozwoju przyszłych strategii terapeutycznych w leczeniu kryptokokozy i innych zakażeń wewnątrzkomórkowych.**

## **PODSUMOWANIE WYNIKÓW OPISANYCH W PUBLIKACJACH WYBRANYCH DO OCENY**

### **Publikacja nr 1**

Qiu Y, Dayrit J, Davis MJ, Hadd ZD, Meister DL, Osterholzer JJ, Williamson PR, Olszewski, MA. Immune modulation mediated by cryptococcal laccase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice. **PLoS ONE** 7(10): e47853. doi:10.1371/journal.pone.0047853, **2012**

Ze względu na zdolność rozsiewu do centralnego systemu nerwowego (CNS), *C. neoformans* jest jednym z głównych czynników zakaźnych powodujących śmiertelność poprzez zakażenie CNS w skali światowej. Badania z pierwszej publikacji skoncentrowały się na roli enzymu lakazy w patogenezie kryptokokozy. Lakaza jest enzymem z rodziny oksydoreduktaz (oksydaza difenolowa) występującym u roślin, grzybow i innych mikroorganizmów. Dotychczasowe badania z zakażeniami eksperymentalnymi zwierząt wykazały, że lakaza promuje rozsiew kryptokoka do CNS. Na poziomie biochemicznym odkryto zaś, że kryptokokowa lakaza jest odpowiedzialna za biosyntezę melaniny, pigmentu o silnych właściwościach anty-oksydacyjnych i prostaglandyny E2. Oba te czynniki mają potencjał oddziaływania na systemem odpornościowy: melanina- przeciwstawiając się oksydacyjnym mechanizmom niszczenia mikroorganizmów przez leukocyty a prostaglandyna- modulując odpowiedź odpornościową poprzez aktywację receptorów prostaglandynowych leukocytów. Nasze artykuł przedstawił wyniki pracy eksperymentalnej, poświęconej opracowaniu mechanizmów poprzez które lakaza promuje rozsiew kryptokoka do CNS. Do celów badawczych zastosowaliśmy zjadliwy szczep macierzysty *C. neoformans* serotypu A - H99, który charakteryzuje się wysoką ekspresją lakazy oraz jego mutant (*lac1Δ* z usuniętym genem *LAC1*

kodującym lakazę w genomie kryptokoka. Analiza porównawcza myszy zakażonych dotchawczo szczepem H99 i mutantem *lac1Δ* wykazała że: ekspresja lakazy nie była wymagana do propagacji *C. neoformans* w zainfekowanych płucach przed wytworzeniem odporności swoistej (do 7-miu dni), natomiast znacząco przyczyniła się do rozrostu kryptokoka w płucach w dwa i trzy tygodnie po infekcji, czyli w okresie kiedy u myszy wytworzona jest już odporność swoista. Ekspresja lakazy była również konieczna do rozsiewu mikroorganizmu do CNS. Dalsze próbnanie parametrów immunologicznych wykazało, że eliminacja kryptokokowej lakazy spowodowała: 1) zwiększenie napływu CD4+ i CD8+ limfocytów T do płuc, 2) zmniejszenie napływu eozynofiliów, 3) zwiększoną produkcję cytokin Th1 i Th17 i zmniejszenie cytokin Th2, 4) zmianę aktywacji makrofagów z M2 w kierunku pożądanej M1. Te wyniki wykazały, że kryptokokowa lakaza spowodowała zakłócenie w wytworzeniu się ochronnej reakcji odpornościowej (Th1 i Th2) wspierając rozwój „przeciwstawnej” odpowiedzi typu Th2. Dalsze wniki analizujące Th polaryzację w węzłach chłonnych pomiędzy 1-2 tygodniem po infekcji potwierdziły słuszność tej hipotezy, demonstrując silną indukcję ochronnych cytokin Th1 i Th17 w przypadku braku lakazy i kontrastując z indukcją niepożądanych cytokin Th2 w jej obecności. By wykazać, że immunomodulacja wywołana pod wpływem lakazy przyczyniła się do rozsiewu *C. neoformans* do CNS dokonaliśmy przeszczepu CD4+ limfocytów T pobranych z węzłów chłonnych od myszy zakażonych szczepami H99 lub *lac1Δ* do zdrowych myszy „biorców”. Następnie myszy biorcy i myszy kontrolne zostały zakażone szczepem H99 by porównać u nich poziom rozsiewu H99 z płuc do CNS. Biorcy komórek CD4 od dawców zakażonych H99, wykazywały średnio 100-krotnie większy poziom infekcji w CNS niż myszy kontrolne, natomiast biorcy komórek CD4 od myszy zakażonych *lac1Δ* wykazały średnio 100-krotnie niższy poziom infekcji w CNS niż myszy kontrolne.

## Publikacja nr 2

Eastman AJ, He X, Qiu, Y, Davis MJ, Vedula P, LyonsDM, ParkYD; Hardison SE; Malachowski A; Wormley FL; Williamson PR, Olszewski MA. Cryptococcal Heat Shock Protein 70 Homolog Ssa1 Contributes to Pulmonary Expansion of *Cryptococcus neoformans* during the Afferent Phase of the Immune Response by Promoting Macrophage M2 Polarization. ***J Immunol.*** 194:5999-6010, **2015**

Kryptokokowy czynnik Ssa1, jako jeden z rodziny białek szoku cieplnego pełni wielorakie wewnętrzne funkcje komórkowe. Na podstawie wyników eksperymentalnych infekcji u myszy, stosując szczep macierzysty rzadziej spotykanego serotypu D oraz jego mutant  $\Delta$ ssa1 stwierdzono, że czynnik Ssa1 czynnik transkrypcyjny genu lakazy i najprawdopodobniej w ten sposób wzmacnia zjadliwość kryptokoka. Jednocześnie Ssa1 jest eksportowany w dużych ilościach do kapsuły zewnętrznej kryptokoka, gdzie może oddziaływać na różne elementy systemu odpornościowego. W związku z tym nasza hipoteza zakładała, że całokształt oddziaływania Ssa1 na systemem odpornościowy złoży się z wpływów zależnych i niezależnych od lakazy. Po

skonstruowaniu szczepu  $\Delta ssa1$  w oparciu o szczep macierzysty H99 (najbardziej rozpowszechnionego serotypu A), oraz szczepu komplementarnego z przywróconym genem *Ssa1*, porównaliśmy ich zjadliwość w doświadczalnym modelu infekcji dotchawiczej u myszy. Porównanie wyników objęło: wzrost drobnoustroju w płucach i w CNS, przeżywalności zakażonych myszy, oraz analizy głównych parametrów swoistej i nieswoistej odpowiedzi odpornościowej.

W przeciwieństwie do efektów lakazy, usunięcie genu *SSA1* spowodowało wyraźny spadek namnażania się kryptokoka w płucach w okresie odpowiedzi nieswoistej (3 i 7 dni po zakażeniu) i stopniowe zacieranie się tych różnic w okresie odpowiedzi swoistej (14 dni i więcej po zakażeniu). Co więcej, zaobserwowaliśmy rozrost kryptokoka  $\Delta ssa1$  w mózgu zainfekowanych myszy i raczej niewielkie wydłużenie okresu przeżywalności myszy zakażonych szczepem  $\Delta ssa1$  w porównaniu z myszami zakażonymi szczepem H99 i szczepem komplementarnym. Te wyniki były zupełnie odmienne od tych zaobserwowanych w badaniach nad lakazą, motywując dalszą analizę szczepu  $\Delta ssa1$  w serotypie A. Badania w naszym szczepie  $\Delta ssa1$  nie wykazywały zmian w aktywności lakazy, pomimo potwierdzonego braku ekspresji *Ssa1*, wskazując na to, że szczep H99 nie wymagał czynnika *Ssa1* do produkcji lakazy. Dalsza charakteryzacja odpowiedzi odpornościowej wykazała, że czynnik *Ssa1* wywołał bezpośrednią zmianę polaryzacji makrofagów z M1 na M2 w fazie odporności nieswoistej, ale nie w późniejszej fazie odporności swoistej, w której nasilona produkcja cytokin Th2 spowodowała jednorodną polaryzację M2 makrofagów we wszystkich grupach zakażonych myszy. Z tych wyników wywnioskowaliśmy, że mechanizm zjadliwości czynnika *Ssa1* w szczepie H99 (serotypu A) był niezależny od lakazy, w przeciwieństwie do tego co zaobserwowano w serotypie D. Odseparowanie funkcji obu czynników w serotypie A pozwoliło nam „odsłonić” bezpośredni efekt czynnika *Ssa1*, który przyczynił się do zwiększonego rozrostu kryptokoka w fazie odpowiedzi nieswoistej poprzez „wczesną” polaryzację M2 makrofagów.

### Publikacja nr 3

Qiu Y, Davis MJ, Dayrit JK, Carolan J, Osterholzer JJ, Curtis JL, Olszewski, MA. Scavenger receptor A modulates the immune response to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection.

***J Immunol.* 191(1):238-48, 2013**

Receptory “scavenger” stanowią grupę receptorów w makrofagach i innych komórkach, która służy do pobierania i eliminacji obcych substancji i produktów odpadowych z organizmu przez komórki fagocytarne. Poza główną funkcją, receptory te mogą uczestniczyć w obronie organizmu przed mikroorganizmami, jako tzw PRR (receptory rozpoznające patogeny). Jednym z głównych przedstawicieli receptorów scavenger w komórkach makrofagów jest SRA (Scavenger receptor A). Nasz artykuł poraz pierwszy określił rolę SRA w czasie odpowiedzi odpornościowej na zakażenie *C. neoformans*. W tym celu, zakaziliśmy dwie grupy myszy, SRA+/+ (typ dziki) i myszy SRA-/- pozbawione genu kodującego SRA, szczepami *C. neoformans* H99 i lac1 $\square$ . Analiza porównawcza

parametrów odporności w fazach odporności nieswoistej (7 dni) i odpowiedzi swoistej (21 i 28 dni) wykazała, że myszy SRA<sup>-/-</sup> były w stanie powstrzymać rozrost obu szczepów kryptokoka, co w obu przypadkach zaowocowało poprawą przeżywalności. Ten pozytywny skutek usunięcia receptora SRA był związany ze zwiększoną akumulacją limfocytów T i zmniejszoną akumulacją eozynofiliów w płucach zakażonych myszy. Kolejne wyniki wskazały na usprawnienie wielu aspektów odpowiedzi obronnej organizmu w związku z nieobecnością SRA: 1) zwiększoną ekspresję receptorów kostymulujących limfocyty T CD80 i CD86 przez komórki prezentujące antygen (makrofagi i komórki dendrytyczne); 2) zmniejszoną produkcję cytokin Th2 i interleukiny-10 w zakażonych płucach i splenocytach stymulowanych antygenem kryptokokowym; 3) zmniejszony poziom immunoglobuliny E w surowicy; 4) zwiększenie cech klasycznej (M1) aktywacji makrofagów. Te zmiany poprzedzone były zwiększeniem ekspresji czynników wzmagających polaryzację Th1 w węzłach chłonnych na terenie płuc. W podsumowaniu, nasze badania wykazały, że *C. neoformans* wykorzystuje receptor SRA do zaburzenia mechanizmów wiodących do rozwoju ochronnej odpowiedzi Th1, co w efekcie prowadzi do natężenia niekorzystnej odpowiedzi Th2 i zaburzenia eliminacji patogenu. Co więcej, negatywne skutki oddziaływania kryptokoka na rozwój odporności poprzez SRA aczkolwiek przypominały swoim efektem wpływ lakazy, były niezależne od ekspresji tego enzymu. Nasza publikacja była pierwszym doniesieniem na temat roli SRA w odporności przeciwko *C. neoformans*, opisując nowy przykład wykorzystania rodzimego PRR przez atakujący patogen do zaburzenia procesów obronnych.

#### Publikacja nr 4

Davis MJ, Tsang T, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, Olszewski, MA. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. **MBio** 4(3)/mBio. 00264-13, **2013**

Stan polaryzacji makrofagów: korzystnej -M1 lub niekorzystnej -M2 jest wskaźnikiem prawidłowej lub nieprawidłowej odpowiedzi organizmu na zakażenie kryptokokiem. Makrofagi odgrywają kluczową rolę w walce z *C. neoformans*, ponieważ w zależności od poziomu aktywacji, mogą niszczyć zakażające je kryptokoki lub też stawać się rezerwuarem namnażających się drobnoustrojów. Nasze wcześniejsze badania wykazały, że stan polaryzacji makrofagów w zakażonych płucach ewoluuje w czasie tej długotrwałej infekcji, odzwierciedlając fluktuację poziomu cytokin polaryzujących makrofagi (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 i IL-13). Jednakże nie wiedzieliśmy czy te zmiany w profilu aktywacji makrofagów wywołane były poprzez wymianę uprzednio spolaryzowanych komórek jednego rodzaju poprzez nowe, czy też te same komórki makrofagów zmieniają profil aktywacji z M1 na M2 i odwrotnie. Nasze badania przeprowadzone *in vitro* polegały na inkubacji makrofagów wyprowadzonych z linii komórkowych oraz pierwotnych komórek szpiku kostnego myszy (bone marrow derived macrophages, BMM) w różnych

kombinacjach cytokin, z i bez kryptokoka, by określić wpływ tych warunków na polaryzację makrofagów. Następnie poprzez zmiany tych warunków naszym celem było określenie zdolności spolaryzowanych wcześniej makrofagów do zmiany ich profilu aktywacji (plastyczność polaryzacji makrofagów). Nasze badania wykazały, że cytokiny IFN- $\gamma$  i IL-4 były odpowiednio najsilniejszymi czynnikami polaryzacji M1 i M2, bez względu na to, czy makrofagi były inkubowane w obecności czy pod nieobecność *C. neoformans* i bez względu na źródło ich pochodzenia (linia komórkowa czy BMM). Dalsze badania wykazały, że makrofagi skrajnie spolaryzowane przez cytokiny do stanu M1 lub M2, po wymianie tych cytokin były w stanie odwrócić stan polaryzacji w przeciągu 24 godzin, stosownie do właściwości ostatniego czynnika zastosowanego do polaryzacji makrofagów. Te zmiany na poziomie ekspresji głównych genów charakteryzujących profile M1 i M2 przekładały się na poziom hamowania wzrostu *C. neoformans* przez makrofagi, zgodnie ze stanem polaryzacji wywołanym poprzez ostani z zastosowanych czynników i bez względu na jej pierwotny profil. W podsumowaniu, nasze wyniki wykazały, że profile M1 i M2 makrofagów są podatne na plastyczne zmiany w odpowiedzi na zastosowane czynniki zewnętrzne. Ta właściwość makrofagów opisana w tej pracy, może być wykorzystana do opracowania nowych terapii zmierzających do przywrócenia polaryzacji M1 makrofagom w kryptokozie i innych uporczywych chorobach (jak n.p. gruźlica), w które wymagają polaryzacji M1 do zniszczenia infekującego je drobnoustroju.

### Publikacja nr 5

Davis MJ, Eastman AJ, Qiu Y, Gregorka B, Kozel TR, Osterholzer JJ, Curtis JL, Swanson J, Olszewski, MA. *Cryptococcus neoformans*-induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence. ***J Immunol.* 194: 2219-2231, 2015**

Makrofagi w stanie niekompletnej polaryzacji lub aktywacji M2 zachowują zdolność fagocytozy kryptokoka, aczkolwiek organizm przeżywa i namnaża się w tych komórkach. Naszym celem było określenie mechanizmu zapewniającego przeżycie *C. neoformans* lizosomie a nawet jego namnażanie się wewnątrz tych organelli komórkowych. Ponieważ poprzednie prace sugerowały, że kryptokoki mogą powodować uszkodzenie lizosomów, przeprowadziliśmy badania przyżyciowego stanu integralności lizosomów w kulturach makrofagów BMM i w czasie zakażenia płucnego *C. neoformans* u myszy. Uszkodzenie lizosomów zostało określone ilościowo poprzez mikroskopię fluorescencyjną żywych makrofagów zakażonych *C. neoformans*. Zawartość lizosomów w tych makrofagach została oznakowana fluorescencyjnym wskaźnikiem FITC-dextran a fotografie cyfrowe żywych komórek wykonano w określonych przedziałach czasowych po zakażeniu kryptokokiem. Nasza analiza kilkuset fotografii z zastosowaniem metody ratiometrycznej wykazała, że sfagocytowane żywe, ale nie zabite kryptokoki uszkadzały lizosomy makrofagów. Uszkodzenie to zwiększało się z upływem czasu i było proporcjonalne do liczby wewnątrzkomórkowych kryptokoków. Nasze dalsze badania *in vitro*, pokazały że poziom



uszkodzenia lizosomów był współzależny ze zwiększoną replikacją wewnątrzkomórkowych kryptokoków. Ponadto uszkodzenie lizosomów wywołane światłem laserowym spotęgowało wewnątrzkomórkowe namnażanie się kryptokoków. Równocześnie, przeprowadziliśmy analizę wieloparametrowej cytometrii przepływowej komórek wyizolowanych z płuc, opracowując nową metodę oznaczenia poziomu przeżyciowego uszkodzenia lizosomów u zainfekowanych myszy. Ta metoda wskazała, że komórki zawierające kryptokoki, wyizolowane od zakażonych myszy, charakteryzowały się natężonymi cechami uszkodzenia lizosomów, w porównaniu z makrofagami niezakażonych myszy lub, makrofagami z zakażonych płuc, które nie sfagocytowały kryptokoków. Stymulacja makrofagów IFN- $\gamma$  (polaryzacja M1) zapobiegła uszkodzeniu lizosomów równolegle ze zwiększonym wewnątrzkomórkowym zabijaniem kryptokoków przez makrofagi. W podsumowaniu, uszkodzenie lizosomów jest ważną „strategią przyżywania” kryptokoków wewnątrz makrofagów, natomiast klasyczna aktywacja M1 makrofagów pozwala zapobiec uszkodzeniu lizosomów i wewnątrzkomórkowemu wzrostowi patogenu.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)**

### **Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora nauk klinicznych**

Po ukończeniu VI liceum Ogólnokształcącego w Warszawie w profilu biologiczno-chemicznym, podjąłem studia magisterskie dzienne na Wydziale Weterynaryjnym Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, które ukończyłem w 1988 r. Ponieważ od wczesnych lat interesowałem się nauką, bezpośrednio po studiach rozpocząłem pracę na Wydziale Weterynaryjnym SGGW, na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego na oddziale chorób wewnętrznych.

Poza dużym zaangażowaniem w pracę dydaktyczną (ok. 300 godzin rocznie), podjąłem pierwsze badania naukowe. Te badania skupiły się na funkcji leukocytów w układzie oddechowym koni. W czasie mojej pracy na SGGW wygrałem konkursowe stypendium i odbyłem siedmiomiesięczny staż naukowy na Uniwersytecie Weterynaryjnym w Wiedniu w 1991 r., gdzie dalej rozwijałem badania granulocytów w drogach oddechowych u koni z chronicznym schorzeniem dróg oddechowych (COPD). Łącznie badania w Warszawie i Wiedniu pozwoliły mi na zapoznanie się z podstawowymi technikami laboratoryjnymi i zaowocowały dwoma oryginalnymi artykułami z zakresu produkcji reaktywnych form tlenu i fagocytozy przez neutrofile wyizolowane z dróg oddechowych koni z COPD (Olszewski i Laber, Wien Tierärztl Monatsschr 80: 332-337, 1993; Kluciński, Winnicka, Olszewski i wsp. J Vet Med A 41: 558-567, 1994).

Moje badania dały mi również możliwość nawiązania kontaktu naukowego z Prof. N.E. Robinsonem (Department of Large Animal Clinical Sciences, Michigan State University, East Lansing, USA), który zaowocował wspólnie przygotowanym projektem konkursowym, złożonym do Fundacji Kościuszkowskiej w USA w 1991 r. Pod koniec roku 1992 jako stypendysta Fundacji Kościuszkowskiej rozpocząłem badania nad wpływem reaktywnych form tlenu na kurczliwość

mięśni gładkich w drogach oddechowych koni, pod kierunkiem doktora Robinsona, które następnie rozwijałem i kontynuowałem jako doktorant w tym samym laboratorium.

Studia doktorskie w międzydyscyplinarnym programie nauk klinicznych dużych zwierząt (fizjologia/farmakologia/nauki kliniczne) odbywałem w latach 1993-1997 pod kierunkiem Prof. N. E. Robinsona. Jego wskazówki i rady pozwoliły mi na zdobycie niezbędnego doświadczenia w badaniach nad rolą komórek i mediatorów zapalnych w patogenezie przewlekłych schorzeń dróg oddechowych. Te studia pozwoliły mi na rozwój w zakresie planowania eksperymentalnego, zastosowania kompleksowych modeli zwierzęcych, integracji wyników badań *in vitro* i *in vivo*, oraz pomiarów funkcji komórek w ko-kulturach izolowanych tkanek z aktywowanymi leukocytami. Rozprawa wniosła szereg nowości, w tym odkrycie, że regulacja cholinergicznego kurczliwości dróg oddechowych nie jest spowodowana aktywnością neutrofilów w drogach oddechowych (tzn. produkcją wolnych rodników i innych mediatorów neutrofilów prowokowanych fagocytozą), natomiast jest silnie spotęgowana progowymi koncentracjami mediatorów anafilaksji (mastocytów i bazofilów): histaminy, serotoniny i leukotrienu D4. Te wpływy mediatorów anafilaksji były spowodowane zwiększonym wydzielaniem acetylocholiny z pobudzonych zakończeń nerwowych i zwiększoną pobudliwością mięśni gładkich. Wyniki te zostały zebrane w trzech publikacjach (Olszewski i wsp. *Respiratory Physiol* 109: 167-176, 1997; Olszewski i wsp. *J Appl Physiol* 273: 997-1001, 1997; Olszewski i wsp. *Am J Physiol: Lung* 276: 522-529, 1999). W laboratorium prof. Robinsona włączyłem się również do innych badań, które pomogły wyjaśnić mechanizm paradoksyjnego skurczu oskrzeli, poprzez przeciwastmatyczne leki beta-adrenergiczne (broncholityki). Te leki, poprzez akumulację cyklicznego AMP w komórkach nerwowych, zwiększają wydzielanie acetylocholiny z zakończeń nerwowych w drogach oddechowych, co w efekcie może spowodować tzw. paradoksyjny skurcz oskrzeli (Zhang, Olszewski i wsp. *Am J Physiol* 268 (Lung Cell Mol Physiol 12): 950-956, 1995; Zhang, Zhu, Olszewski i wsp. *Am J Physiol* 274 (1 Pt 1): 32-38, 1998).

### **Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora nauk klinicznych**

Po obronie pracy doktorskiej w grudniu 1997 r. kontynuowałam pracę naukową w USA. Moim celem było wprowadzenie do arsenału moich badań eksperymentalnych technik biologii molekularnej i modeli transgenicznych.

Praca jako Postdoctoral Fellow (adiunkt) w Szkole Medycznej Uniwersytetu Michigańskiego w Ann Arbor (1998-2001), wprowadziła te nowe elementy do moich badań i jednocześnie pozwoliła mi kultywować moje główne zainteresowania badawcze nad funkcjonowaniem komórek systemu odpornościowego w układzie oddechowym. Tę pracę prowadziłem pod kierunkiem profesorów: Galena Toews'a, ordynatora Oddziału Pulmonologii w szpitalu Szkoły Medycznej Uniwersytetu Michigańskiego i Gary Huffnagle, profesora mikrobiologii i immunologii, a jej głównym celem było rozpoznanie różnych elementów odporności przeciwko patogennemu drożdżakowi *Cryptococcus*

*neoformans* w celu ich przywrócenia/wzmocnienia jako możliwej opcji terapeutycznej.

Badania nad tym, wciąż niewystarczająco poznanym mikroorganizmem, są niezmiernie ważne, ponieważ atakuje on osoby z różnymi defektami systemu odpornościowego, szczególnie pacjentów z HIV i biorców transplantowanych organów. Pomimo leczenia infekcja ta jest śmiertelna u 60% pacjentów, a rozpoznawana jest u blisko miliona pacjentów rocznie.

Moje pierwsze badania skupiły się nad udziałem chemokiny CCL3 w formowaniu odporności przeciwko infekcji *C. neoformans*. W pierwszym cyklu badań, pracując z modelem kryptokokowej infekcji u myszy, wykazaliśmy, że w czasie inicjacji odpowiedzi immunologicznej (wczesna faza odpowiedzi odpornościowej) CCL3 zapobiega niekorzystnej polaryzacji Th2 limfocytów T i związanej z nią progresją infekcji i immunopatologii rozwijającej się w fazie odporności swoistej.

Była to pierwsza obserwacja wskazująca na bezpośredni wpływ CCL3 na polaryzację Th1 systemu odpornościowego w czasie infekcji grzybiczej (Olszewski i wsp. *J Immunol* 165: 6429-36, 2000).

Nasz kolejny artykuł (Olszewski i wsp. *Infect and Immun* 69: (10) 6256-63, 2001) poświęcony był interakcji pomiędzy CCL3 i innymi cytokinami w czasie inicjacji odpowiedzi odpornościowej przeciwko *C. neoformans*. Te badania wykazały, że efekty CCL3 są zróżnicowane w zależności od indukcji innych zapalnych cytokin

w zainfekowanych płucach. W sytuacji silnej reakcji zapalnej chemokina CCL3 nie jest niezbędna do rozwoju odporności, jednakże w sytuacji gdy nieswoista indukcja cytokin TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$  jest słaba, CCL3 może samodzielnie odgrywać znaczącą rolę dla rozwoju właściwej odpowiedzi immunologicznej.

W okresie moich badań post-doktoranckich, zostałem również zaproszony do współpracy z grupą profesora Bakera na Oddziale Alergii. Ta współpraca zaowocowała kolejnym artykułem poświęconym zastosowaniu nanoemulsji do optymalizacji szczepionki przeciw grypie (Myc A i wsp. "Development of immune response that protects mice from viral pneumonitis after a single intranasal immunization with influenza A virus and nanoemulsion." *Vaccine* 21: 3801-3814, 2003).

W trakcie moich badań uzyskałem możliwość szkolenia (1999-2001) i pracy jako niezależny pracownik naukowy (od 2002) w ośrodku badawczym Szpitala Ministerstwa (Departamentu) do Spraw Weteranów (Ann Arbor, USA), który pozostaje w ścisłej afiliacji z Uniwersytetem Michigańskim. Początkowo kontynuowałem współpracę z profesorami Toewsem i Huffnagle, w tym czasie, koncentrując się na roli kryptokokowej ureazy jako czynnika wzmagającego rozsiew kryptokoka do centralnego systemu nerwowego (Olszewski i wsp. *Am J Pathol* 164: 1761-1771, 2004 "Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing CNS invasion"). Inwazja CNS jest główną przyczyną śmiertelności w kryptokokozy człowieka i praca ta była już cytowana w ponad 80 różnych artykułach.

Praca ta zapoczątkowała serię dalszych badań nad efektami ureazy i innych czynników zjadliwości w różnych aspektach patogenezy kryptokokozy i w formowaniu odporności przeciwko

*C. neoformans.*, które od 2002 r. prowadziłem już we własnym laboratorium w ośrodku badawczym Szpitala Departamentu (Ministerstwa) d/s Weteranów. Te oryginalne badania zaowocowały następującymi artykułami opublikowanymi w latach 2009-2015:

- 1) Osterholzer JJ, Surana R, Milam JE, Montano GT, Chen GH, Sonstein J, Curtis JL, Huffnagle GB, Toews GB, Olszewski MA: Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *Am J Pathol*; 174: 932-943, 2009
- 2) He X, Lyons DM, Toffaletti DL, Zhang Y, Wang F, Qiu Y, Lee A, Dayrit J, Perfect JR, Olszewski, MA. Virulence factors identified by *Cryptococcus neoformans* mutant screen differentially modulate lung immune responses and brain dissemination. *Am J Pathol*; 181: 1356-1366, 2012
- 3) Qiu Y, Davis MJ, Dayrit J, Hadd ZD, Meister DL, Osterholzer JJ, Williamson PR, Olszewski, MA. Immune modulation mediated by cryptococcal laccase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice. *PLoS ONE* 7(10): e47853: 2012
- 4) Eastman AJ, He X, Qiu, Y, Davis MJ, Vedula P, LyonsDM, ParkYD; Hardison SE; Malachowski A; Wormley FL; Williamson PR, Olszewski MA. Cryptococcal heat shock protein 70 homolog Ssa1 contributes to pulmonary expansion of *Cryptococcus neoformans* during the afferent phase of the immune response by promoting macrophage M2 polarization. *J Immunol*: 194(12): 5999-6010, 2015

Te badania łącznie pozwoliły zidentyfikować rolę sześciu genów zjadliwości oraz mechanizmy modyfikacji swoistej i nieswoistej odporności przez te czynniki.

Poza pracą nad czynnikami zjadliwości, kontynuowałem własne badania nad naturalnymi czynnikami/mechanizmami obronnymi w infekcji kryptokokowej oraz we współpracy z innymi ośrodkami. Te badania po raz pierwszy zdefiniowały znaczenie i mechanizm działania następujących czynników systemu odpornościowego w kryptokokozy:

- 1) **GM-CSF**: Chen GH, Olszewski MA, McDonald RA, Wells JC, Huffnagle GB, Toews GB. Role of granulocyte macrophage colony stimulating factor in host defense against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection during murine allergic bronchopulmonary mycosis *Am J Pathol*; 170(3): 1028-1040, 2007
- 2) **Toll Like Receptor 9 (TLR9)**: Zhang Y, Wang F, Tompkins KC, McNamara A, Jain AV, Moore BB, Toews GB, Huffnagle GB, Olszewski MA: Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent

- Cryptococcus neoformans* H99. Am J Pathol; 175: 2489-2500, 2009 oraz Qiu Y, Zeltzer S, Zhang Y, Wang F, Chen G, Murdock BJ, Toews GB, Bhan U, Osterholzer JJ, Standiford TJ, Olszewski, MA. Early induction of CCL7 downstream of TLR9 signaling promotes the development of robust immunity to cryptococcal infection. J Immunol; 188: 3940-3948, 2012
- 3) **Receptor CD40**: Chen G, Osterholzer JJ, Olszewski MA, McDonald R, Choe MY, Huffnagle GB, Toews GB. Dual roles of CD40 on microbial containment and the Development of Immunopathology in Response to Persistent Fungal Infection in the Lung. Am J Pathol; 177: 2459-2471, 2010
  - 4) **Scavenger Receptor A (SRA)**: Qiu Y, Davis MJ, Dayrit JK, Carolan J, Osterholzer JJ, Curtis JL, Olszewski, MA. Scavenger receptor A modulates the immune response to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. J Immunol; 191(1): 238-248, 2013
  - 5) **Kinaza BTK**: Szymczak WA, Davis MJ, Lundy SK, Dufaud C, Olszewski, MA, Pirofski L. X-linked immunodeficient mice exhibit enhanced susceptibility to *Cryptococcus neoformans* infection. MBio. 4(4). pii: e00265-13, 2013
  - 6) **Interleukina (IL)-17**: Murdock BJ, Huffnagle GB, Olszewski MA, Osterholzer JJ. IL-17 enhances host defense against cryptococcal lung 1 infection through effects mediated by leukocyte recruitment, activation, and IFN- $\gamma$  production. Infect Immun. 82(3): 937-948, 2014
  - 7) **IL-10**: Murdock BJ, Teitz-Tennenbaum S., Chen G, Curtis JL, Olszewski MA, Osterholzer JJ. Early or Late IL-10 Blockade Enhances Th1 and Th17 Effector Responses and Promotes Fungal Clearance in Mice with Cryptococcal Lung Infection. J Immunol;193(8): 4107-4116, 2014
  - 8) **STAT1**: Leopold Wager CM, Camaron RH, Wozniak KL, Olszewski MA, Wormley FL. STAT1 Signaling is Essential for Protection against *Cryptococcus neoformans* Infection in Mice. J Immunol;193(8): 4060-4071, 2014

Poza powyższymi badaniami, prowadziliśmy szerokie badania nad rolą cytokin, polaryzacji Th1, Th2 i Th 17, funkcją komórek dendrytycznych, funkcjonowaniem, polaryzacją i plastycznością makrofagów w infekcjach wywołanych przez drobnoustroje *C. neoformans*, *S. aureus*, *Pneumococcus* oraz w septycznym uszkodzeniu płuc:

- 1) Mancuso P, Huffnagle GB, Olszewski MA, Phipps J, and Peters-Golden M. Leptin corrects host defense defects following acute starvation in murine pneumococcal pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 173(2): 212-218, 2006
- 2) Olszewski MA, Falkowski NR, Surana R, Sonstein J, Hartman A, Huffnagle GB, Toews GB. Effect of Laparotomy on Clearance and Cytokine Induction in *Staphylococcus aureus*-infected Lungs. Am J Respir Crit Care Med.;176: 921-929, 2007

- 3) Chen GH, McNamara DA, Hernandez Y, Huffnagle GB, Toews GB and Olszewski MA. Inheritance of immune polarization patterns is linked to resistance versus susceptibility to *Cryptococcus neoformans* in a mouse model. *Infect Immun*; 76: 2379–2391, 2008
- 4) Osterholzer JJ, Milam JE, Chen GH, Toews GB, Huffnagle GB, Olszewski MA: Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*, *Infect Immun*; 77: 3749-3758, 2009
- 5) Wozniak KL, Ravi S, Macias S, Young ML, Olszewski MA, Steele C, Wormley FL: Insights into the mechanisms of protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection using a mouse model of pulmonary cryptococcosis, *PLoS One*; 4: e6854, 2009
- 6) Jain A, Zhang Y, Fields BW, McNamara DA, Choe MY, Chen GH, Erb-Downward JR, Osterholzer JJ, Toews GB, Huffnagle GB, and Olszewski MA. Th2 but not Th1 immune bias results in altered lung functions in murine model of pulmonary *C. neoformans* infection. *Infect Immun*; 77: 5389-5399 (12), 2009
- 7) Zhang Y, Wang F, Tompkins KC, McNamara A, Jain AV, Moore BB, Toews GB, Huffnagle GB, Olszewski MA: Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. *Am J Pathol*; 175: 2489-2500, 2009
- 8) Milam JE, Erb-Downward JR, Chen GH, Osuchowski MF, McDonald R, Chensue SW, Toews GB, Huffnagle GB, Olszewski MA: CD11c+ cells are required to prevent progression from local acute lung injury to multiple organ failure and death. *Am J Pathol*; 176(1): 218-226, 2010
- 9) Hardison SE, Ravi S, Wozniak KL, Young M, Olszewski MA, Wormley FL. Pulmonary infection with an interferon-gamma producing *Cryptococcus neoformans* strain results in classical macrophage activation and protection. *Am J Pathol*; 176: 774–785, 2010
- 10) Osterholzer JJ, Chen G, Olszewski MA, Zhang YM, Curtis JL, Huffnagle GB, Toews GB. Chemokine receptor 2-mediated accumulation of fungicidal exudate macrophages in mice that clear cryptococcal lung infections. *Am J Pathol*; 178(1): 198-211, 2011
- 11) Arora S, Olszewski MA, Tsang TM, McDonald R, Toews GB, Huffnagle GB. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 79:1915-1926, 2011
- 12) Davis MJ, Tsang T, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, Olszewski, MA. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio*. 4(3)/mBio 00264-13, 2013
- 13) Davis MJ, Eastman AJ, Qiu Y, Gregorka B, Kozel TR, Osterholzer JJ, Curtis JL, Swanson J, Olszewski, MA. Macrophage lysosome damage is a crucial component of virulence for fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 194: 2219-2231; 2015;

## **Podsumowanie dorobku naukowego**

Mój dorobek naukowy obejmuje 64 pełnych pozycji literaturowych, w tym 55 artykułów oryginalnych w recenzowanych czasopismach naukowych, 9 prac przeglądowych opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. Dodatkowo jestem autorem 6 obszernych sprawozdań z obrad sesji naukowych, oraz 1 rozdziału podręcznika. Dodatkowo należy wspomnieć ponad 100 opublikowanych doniesień zjazdowych (43 w ciągu ostatnich 5-ciu lat) głównie z międzynarodowych sympozjów naukowych. Łączny współczynnik wpływu - Impact Factor (IF) wynosi **260.33** (KBN/MniSW = **987**). Liczba cytowań według bazy Scopus wynosi **1625 (bez samocytowań)**.

Jestem również głównym wykonawcą (principal investigator) pięciu finansowanych projektów badawczych, (3 zakończone i 2 w realizacji), współwykonawcą realizowanego projektu, redaktorem czterech czasopism naukowych (Journal of Immunology, Infection and Immunity, Frontiers in Microbiology i PLoS ONE) i recenzentem ponad 20 czasopism naukowych, w tym: American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, American Journal of Pulmonary and Critical Care Medicine, The Journal of Immunology, European Journal of Immunology, Infection and Immunity, PLoS Pathogens, PLoS One, Journal of Surgical Research, Medical Mycology, Canadian Journal of Microbiology. Recenzuję również projekty badawcze dla Sekcji Chorób Zakaźnych Biura Badań Naukowych VA i Sekcji Mikrobiologii American Heart Association w USA, w Europie dla Welcome Trust, oraz granty sponzorowane przez Unię Europejską (Fundację Nauki Polskiej, Niemieckiej i Austriackiej)

## **Działalność dydaktyczna**

Moją główną działalnością dydaktyczną jest prowadzenie młodych adeptów nauki poprzez etap doktorancki i poddoktorancki, jak i nauczanie w ramach studiów doktoranckich oraz wykładów i laboratoriów dla studentów licencjackich. Działalność ta obejmuje coroczne przygotowanie i prowadzenie podyplomowego kursu „Immunologia Experimentalna” (2011-2017) i wykłady prezentowane na kursach „Mikrobiologii Eukariontów” (2010-2012) na Uniwersytecie Michigańskim. Dodatkowo od roku 1999 prowadzę formalne wykłady w cyklach spotkań międzyzakładowych w Szkole Medycznej Uniwersytetu Michigańskiego aby przekazać moje doświadczenie naukowe i zdobytą wiedzę szerszemu gronu akademickiemu i studentom. Partycypuję również jako instruktor w federalnie sponsorowanych programach szkoleniowych T32 pulmonologii, immunologii i patologii na naszym uniwersytecie. W ramach tych programów prowadzę coroczne wykłady orientacyjne dla nowych doktorantów i poddoktoranckie od 2009 r. oraz staże naukowe w naszym laboratorium. Szkolenia badawcze w moim laboratorium przeprowadzam w oparciu o codzienną naukę nowych, złożonych technik laboratoryjnych, cotygodniowych spotkań o charakterze tête-à-tête, w celu wymiany pomysłów i wiedzy. Organizuję

również grupowe spotkania w ramach „tygodniowych zebrań laboratoryjnych” oraz uczestniczę w przygotowaniach i redagowaniu artykułów, opracowań naukowych i prezentacji.

Od roku 2013 służę jako główny promotor doktorantki z Programu Immunologii (Alison Eastman), a obecnie również jako promotor pomocniczy dwóch doktorantów: (Patrick Dunker i Giovanni Martinez-Colon) Programu Immunologii na Uniwersytecie Michigańskim. Pracowałem również jako promotor pomocniczy (2012-2015) i recenzent pracy doktorskiej dr Elidth Wilson DVM, Ph.D. na wydziale weterynaryjnym Uniwersytetu Stanowego (Michigan State University) (2015).

Od roku 2007 szkolę i nadzoruję pracę badaczy po-doktoralnych, z których 6-ciu ukończyło szkolenie w naszym laboratorium i kontynuuje pracę badawczą w różnych ośrodkach naukowych, a dwoje kontynuuje szkolenie w naszym laboratorium.

Od roku 2000 pracuję również nad szkoleniem laboratoryjnym i projektami badawczymi studentów przeddyplomowych (licencjackich). Ponad 20-stu studentów odbyło 1-4 letnie szkolenia laboratoryjno-badawcze pod moim kierunkiem, 6-ciu przygotowało honorowe prace dyplomowe (Undergraduate Honor Thesis) oraz/lub publikacje jako wynik projektów prowadzonych w naszym laboratorium.



25-go maja 2017

-----  
Podpis i data